

Nachweis von Herzglykosiden
aus dem Mageninhalt

von

Hans Rohr

aus

Wunsiedel



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. H. B. Wuermeling

Nachweis von Herzglykosiden aus dem Mageninhalt

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Hans Rohr
aus
Wunsiedel

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.1980

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Chemische Struktur der Herzglykoside	4
3. Pharmakologie der Herzglykoside	7
3.1 Aufnahme und Verteilung	7
3.2 Metabolismus und Ausscheidung	7
3.3 Therapeutische Wirkungen	7
4. Toxische Wirkungen der Herzglykoside	10
4.1 Vorkommen und Ursache	10
4.2 Vergiftungssymptomatik und Diagnostik	13
4.3 Beobachtungen bei massiven Intoxikationen mit Herzglykosiden	15
5. Therapie der Vergiftungen	18
6. Zusammenstellung von Bestimmungsmethoden für Herzglykoside in biologischem Material	21
6.1 Extraktion	21
6.2 Chromatographische Auftrennung	22
6.3 Qualitativer Nachweis mit Sprühreagenzien	26
6.4 Quantitativer Nachweis der Herzglykoside	35
6.4.1 Densitometrie	35
6.4.2 Spektrophotometrie	36
6.4.3 Enzymhemmungstest	39
6.4.4 Radioimmunoassay	40

7. Eigene Untersuchungen	42
7.1 Extraktion der Herzglykoside	42
7.1.1 Herstellung von Untersuchungsmaterial	42
7.1.2 Extraktion des Untersuchungsmaterials	45
7.2 Qualitatives Dünnschichtchromatographisches Nachweisverfahren	46
7.2.1 Dünnschichtchromatographische Trennung	46
7.2.1.1 Untersuchung der Trenneigenschaften des Laufmittels	49
7.2.2 Identifizierung der Herzglykoside auf dem Chromatogramm	52
7.2.2.1 Sprühreagenzien	52
7.2.2.2 Referenzsubstanzen	57
7.3 Anwendung des Verfahrens für den qualitativen Nachweis der Herzglykoside bzw. ihrer nach Hydrolyse entstandenen Spaltprodukte im Untersuchungsmaterial	63
7.3.1 Nachweis der Herzglykoside im nicht-extrahierten Untersuchungsmaterial	63
7.3.2 Nachweis der Herzglykoside im Chloroformextrakt aus Untersuchungsmaterial	69
7.3.3 Nachweis von Glykosidspaltprodukten im Chloroformextrakt des Untersuchungsmaterials	74
7.3.4 Versuch einer Vorreinigung des glykosidhaltigen Untersuchungsmaterials	80

	Seite
8. Endgültige Arbeitsvorschrift	81
9. Anwendung des Verfahrens für den Nachweis von β - Methyl - Digoxin (Lanitop ^R) in Mageninhalt aus einem Fall von Suizid	90
10. Diskussion	91
11. Zusammenfassung	98
12. Literaturverzeichnis	100

1. Einleitung

Es ist nicht verwunderlich, daß eine so wirksame Stoffgruppe wie die der Herzglykoside, die in der Natur weit verbreitet ist, eine lange Anwendungsgeschichte aufzuweisen vermag. Pflanzen, die herzwirksame Glykoside enthalten, um nur einige zu nennen, sind Adonisröschen, Goldlack, Pfaffenhütchen, Gottesgnadenkraut, schwarze Nieswurz, Oleander, Meerzwiebel, Strophantusarten und, als Arzneipflanzen wichtig, weißer und roter Fingerhut. (Ludewig et al. 1974)

Die ältesten Zeugnisse der Anwendung herzoglykosidhaltiger Pflanzen findet man nach White et al. (1966), bei den Agyptern um 1500 v. Chr. Sie machten sich, wie dann später auch die Römer, ihre diuretischen und emetischen Wirkungen zu Nutze. Das Wissen von diesen Wirkungen der digitalishaltigen Pflanzen blieb über die Jahrhunderte hinweg erhalten und sorgte für deren Anwendung in der Volksmedizin.

Der erste, der die Wirkungen der Digitalispflanze genauer erforschte, war der Edinburgher Arzt William Withering. Im Jahre 1785 erschien sein berühmt gewordenes Buch: "An account of the Foxglove and some of it's medical uses, with practical remarks on Dropsy and other Diseases". Er fand den roten Fingerhut als wirksamen Bestandteil einer Kräutermischung, die eine Kräutersammlerin als Wundermittel für hoffnungslose Fälle einsetzte. Withering erkannte sehr genau, daß Digitalis Purpurea ihre diuretischen Wirkungen nur bei Krankheitsbildern entfaltete, die für Herzinsuffizienz typisch sind, ohne jedoch ihre eigentliche Wirkung als Herzmittel zu begreifen. Auch die Wichtigkeit der Dosierung war ihm schon bekannt.

Durch die Isolierung der Reinglykoside, die Anfang dieses Jahrhunderts gelang, war es möglich geworden, die Wirkung der Herzglykoside, was die Einfuhrseite anbelangt, wesentlich exakter zu steuern.

Die komplizierte Pharmakokinetik dieser Stoffgruppe und vielen Möglichkeiten der Interaktionen mit anderen Substanzen machen jedoch nach wie vor die Digitalistherapie problematisch und erfordern sorgfältige Überwachung des Patienten. Der Patient wird heute in der Regel anhand klinischer Kriterien überwacht. In Zweifelsfällen muß der Serumspiegel der Herzglykoside bestimmt werden, dessen therapeutisches und toxisches Niveau für einige der häufiger eingesetzten Glykoside bekannt ist.

Die heutige Standardmethode für die Bestimmung der Herzglykoside im biologischen Material ist der Radioimmunoassay. Er wird meist im Blut durchgeführt und dient der therapeutischen Überwachung des Patienten. Man konnte ihn auch erfolgreich bei der Bestimmung von Herzglykosiden in Urin oder Obduktionsmaterial anwenden. Mit diesem Verfahren lassen sich noch bemerkenswert geringe Mengen der Glykoside nachweisen. Jedoch verursacht es einen hohen Aufwand an Zeit und Geld, ist an Speziallabors gebunden und steht meist nur während der üblichen Dienstzeiten zur Verfügung. Deshalb entstand das Bedürfnis nach einem vereinfachten Verfahren, das mit chemischen Routinemethoden auskommt, schnell ist und praktisch überall ausgeführt werden kann.

Leider wird ein solches Verfahren kaum die Empfindlichkeit des Radioimmunoassay erreichen und deshalb für die Serumspiegelbestimmung ungeeignet sein. Doch

könnte es als qualitativer Screeningtest im Fall der oralen Aufnahme von Herzglykosiden in Überdosis durchaus in Frage kommen, da diese dann im Mageninhalt in relativ großer Menge vorhanden sein können.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, ein solches Schnellverfahren, das seitens der Klinik gewünscht wurde, auszuarbeiten.

2. Chemische Struktur der Herzglykoside

Grundstruktur der herzwirksamen Glykoside ist das Cyclopentanoperhydrophenanthrengerüst. Nach der Substitution an C₁₇ unterscheidet man zwischen:

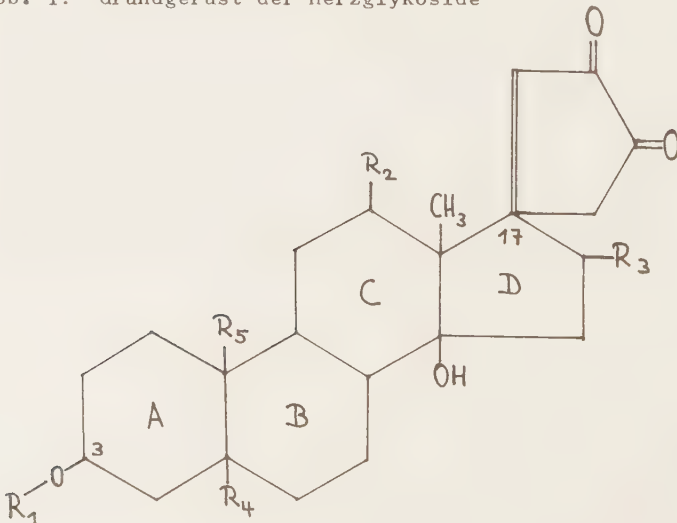
Cardenoliden (Substituent ist ein fünfgliedriger, einfach ungesättigter Lactonring)
z.B. Digitoxin, Digoxin, β -Methyl-, β -Acetyl-Digoxin, Lanatosid C, Convallatoxin

und

Bufadienoliden (Substituent ist ein sechsgliedriger, doppelt ungesättigter Lactonring)
z.B. Proscillaridin

An der OH-Gruppe des C₃-Atoms des Grundgerüsts (= Aglycon oder Genin) ist ein für die einzelnen Glykoside typischer Zucker ätherartig gebunden. Die einzelnen Herzglykoside unterscheiden sich außer im Zuckeranteil auch durch die verschiedenen Substituenten am Aglycon. In Abb. 1 ist das zuckerfreie Grundgerüst der Herzglykoside wiedergegeben, in Tab. 1 eine Aufstellung der für einige wichtige Herzglykoside typischen Substitution des Grundgerüsts.

Abb. 1: Grundgerüst der Herzglykoside



Tab. 1: Substitution des Grundgerüsts bei wichtigen
Herzglykosiden

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Digitoxin	3 x Digitoxose	-H	-H	-H	-CH ₃
Digoxin	3 x Digitoxose	-OH	-H	-H	-CH ₃
β - Methyl - Digoxin	3 x Digitoxose, endständige Digi- toxose methyliert	-OH	-H	-H	-CH ₃
β - Acetyl - Digoxin	3 x Digitoxose, endständige Digi- toxose acetyliert	-OH	-H	-H	-CH ₃
Lanatosid C	Digitoxose-Digitox- ose-Acetylglucose- Digitoxose	-OH	-H	-H	-CH ₃
Convallatoxin	Rhamnose	-H	-H	-OH	-CHO

Da es für die Extraktion der Herzglykoside wichtig ist, ihre Löslichkeit in verschiedenen gebräuchlichen Lösungsmitteln zu kennen, bringt Tab. 2 eine Zusammenfassung der Daten, soweit sie in der Literatur zur Verfügung standen.

Tab. 2: Löslichkeit einiger wichtiger Herzglykoside
(nach Müller et al. 1976)

	Wasser	Äthanol	Aceton	Chloroform	Pyridin
Digitoxin	unsl	0,67g/ /100ml	sls	2,5g/100ml	
Digoxin		0,80g/ /100ml 80%iger Äthanol			
Lanatosid C	ssls	sls	fast unsl	0,05g/ /100ml	20g/100ml

3. Pharmakologie der Herzglykoside

3.1 Aufnahme und Verteilung

Die Resorption der Herzglykoside im Magen steht in enger Beziehung zu ihrer Lipidlöslichkeit. Je höher die Lipidlöslichkeit, umso leichter erfolgt die Resorption. Digitoxin soll zu 100%, Digoxin zu 50-70%, β -Acetyl-Digoxin zu 60-80%, β -Methyl-Digoxin zu 60-90%, Proscillaridin zu 20-40% und Lanatosid C zu 20-40% resorbiert werden. Herzglykoside werden aus galenischen Zubereitungen durchweg schlechter resorbiert (Kuschinsky et al. 1974). Die resorbierten Substanzen erfahren komplizierte Verteilungen und Rückverteilungen und werden in fast allen Geweben in höherer Konzentration als im Blut angereichert. 20-40fache Anreicherungen werden in Niere, Herz, Leber und Nebenniere, eine ungefähr 5fache Anreicherung in Skelettmuskel und Lunge festgestellt. Nur im Gehirn liegt der Glykosidspiegel in gleicher Höhe wie im Blut. 40% der im Organismus vorhandenen Menge befindet sich in der Skelettmuskulatur (Forth et al. 1977). Andersson et al. fanden 1975 bei postmortalen Gewebsanalysen nach Digoxinvergiftungen folgende Gewebsanreicherungen (nach absteigender Konzentration geordnet): Plexus chorioideus, Ventrikelmyocard, Niere, Leber und Skelettmuskel.

3.2 Metabolismus und Ausscheidung

Der Hauptumwandlungsort für die Herzglykoside ist die Leber, welche die Genine entweder durch Epimerisierung

an C_3 oder Glucuronidierung herzunwirksam macht. Die entstandenen Produkte sind biliär oder renal ausscheidungs-fähig (Forth et al. 1977). Diesen Abbauweg, der mit der Abspaltung der Zucker beginnt, durchlaufen in erster Linie Glykoside der Digitoxinreihe. Für diese Glykoside ist die Leber das maßgebliche Ausscheidungsorgan (im Stuhl finden sich 17% einer Dosis), wenn auch ein geringer Teil unverändert über die Niere ausgeschieden wird (8%) (Marcus 1975). Somit ist die Ausscheidung der Digitoxigenin-Glykoside auch bei Niereninsuffizienz gesichert.

Der größte Teil der Digoxigenin-Glykoside wird unverändert renal filtriert (bei Digoxin 80-90%) und nur zum geringen Teil in der Leber durch Glucuronidierung metabolisiert (Forth et al. 1977). Bei Niereninsuffizienz ist also die Ausscheidung dieser Herzglykoside eingeschränkt. Nach Marcus (1975) steigt dann die gastro-intestinale Ausscheidung kompensatorisch etwas an. Ein Nebenweg des Abbaus der Digitoxigenin-Glykoside führt durch Hydroxylierung an C_{12} in die Digoxigeninreihe mit anschließender renal Elimination des entstandenen Digoxigenin-Glykosids (Forth et al. 1977).

Aus diesen Fakten ergeben sich für die toxikologische Analyse folgende wichtige Aussagen:

- a) Den größten Anteil einer in den Organismus aufgenommenen Dosis wird man wegen der Eigenschaft der Herzglykoside, sich in diesen Geweben anzureichern, in Niere, Herz, Leber und Nebenniere finden. Auch die Untersuchung von Urin oder Galle kann Aufschlüsse über die zugeführte Glykosidmenge geben, da die Herzglykoside und ihre Metaboliten über die Niere und die Leber ausgeschieden werden.

- b) Eine dem Organismus verabreichte Dosis von Herzglykosiden wird durch den Metabolismus nicht zu uncharakteristischen Verbindungen abgebaut. Stattdessen enthalten die Metaboliten das typische Steroidgerüst und ermöglichen somit indirekt den eindeutigen Nachweis der Glykoside. Somit ist der Nachweis einer Aufnahme der Herzglykoside in Überdosis vor allem ein Problem der möglichst vollständigen Materialasservierung, der Extraktion und der Identifizierungsmethode.

3.3 Therapeutische Wirkungen

Die therapeutische Wirkung der Herzglykoside kommt dem Genin zu, nicht dem Zuckeranteil, von welchem das pharmakokinetische Verhalten der Substanz abhängig ist. Die herzaktive Wirksamkeit des Genins hängt von der Verknüpfung der Ringe ab: die Ringe A und B müssen in cis-Anordnung verknüpft sein, ebenso die Ringe C und D. Die Ringe B und C sind in trans-Stellung verknüpft. Zusätzlich müssen der 17-Lactonring und die 3-OH-Gruppe die B-Stellung besitzen. Nur die Genine mit ungesättigtem Lactonring haben eine starke therapeutische Wirkung; ist der Lactonring hydriert, so ist auch die Wirkung wesentlich schwächer (Kuschinsky et al. 1974).

Im einzelnen treten folgende therapeutische Wirkungen am Herzen auf:

Eine positiv inotrope Wirkung oder eine Zunahme der Kraftentwicklung mit Erhöhung der Verkürzungs- und der Auswurfgeschwindigkeit wird beobachtet. Dadurch werden Schlag-

und Minutenvolumen erhöht und der Ventrikel vermehrt entleert. Auf Grund des erhöhten Vorwärtsvolumens nimmt die Blutversorgung der Peripherie zu; und der intravasale Druck nimmt in dem Kreislaufabschnitt, der dem insuffizienten Herzteil vorgeschaltet ist, ab. Dies hat zur Folge, daß die durch Stau entstandenen Ödeme verschwinden. Auch die Nierendurchblutung nimmt wegen des gesteigerten Herzminutenvolumens zu und damit auch die Diurese. Dadurch wird die Ödemausschwemmung sehr stark gefördert.

Die Herzfrequenz sinkt aufgrund der vagomimetischen Eigenwirkung der Herzglykoside, der Verringerung der Leitungsgeschwindigkeit infolge eines Membraneffektes und durch Abnahme des Sympathicustonus wegen der verbesserten Kreislauftsituation. Durch diese Frequenzabnahme wird die Arbeitsleistung des Myokards ökonomisiert und seine Durchblutung verbessert (Forth et al. 1977).

4. Toxische Wirkungen der Herzglykoside

4.1 Vorkommen und Ursache

Die Vergiftung mit Herzglykosiden aus akzidenteller, suicidal oder homicidaler Ursache ist relativ selten. Dagegen kommt es im Verlauf einer Digitalistherapie häufig zu Überdosierungen mit toxischen Erscheinungen. Nach Forth et al. (1977) soll dies in 7-22% der Behandlungen vorkommen. Wenn man die große Zahl der Patienten bedenkt, so wird ersichtlich, wie häufig diese Art der Digitalisvergiftung ist.

Die Häufigkeit der schleichenden iatrogenen Digitalisvergiftung ist in Anbetracht der Schwierigkeiten, die Therapie zu steuern, nicht verwunderlich. Die Schwierigkeiten liegen einerseits in der geringen therapeutischen Breite der Herzglykoside, andererseits in den individuellen Gegebenheiten des Patienten. Nach Forth et al. (1977) führt schon die Verdoppelung der täglichen oralen Erhaltungsdosis in etwa 70% der Fälle zum Auftreten toxischer Wirkungen. Nach Kuschinsky et al. (1974) ist dazu das 1,5 bis 3fache der Erhaltungsdosis notwendig.

Forth et al. (1977) geben für einige Herzglykoside die in der Therapie gebräuchlichen oralen Erhaltungsdosen an:

Digitoxin	0,10 - 0,15 mg	B-Acetyl-Digoxin	0,40 mg
Digoxin	0,25 - 0,37 mg	B-Methyl-Digoxin	1,40 mg
Lanatosid C	1,00 mg	Proscillaridin	1,00 mg

Zu den individuellen Variablen zählt die Funktion der Ausscheidungsorgane Leber und Niere, die neben der oralen Zufuhr den Serumspiegel bestimmt. Vor allem bei Niereninsuffizienz besteht die Gefahr der Glykosidüberdosierung.

Weitere mit den Herzglykosiden synergistisch wirkende Faktoren sind nach Forth et al. (1977) und Smith et al. (1973):

Hypokaliämie Hypomagnesiämie, Hypercalcämie, Hypothyreose sowie Hypoxie, entzündliche Veränderungen des Myocards, Art und Schweregrad der zugrundeliegenden Herzkrankheit. Wegen der unberechenbaren Veränderlichkeiten dieser Faktoren können unter der Therapie plötzlich

klinisch nachweisbare Überdosierungserscheinungen auftreten. Die bei vollem klinischen Effekt und bei toxischen Erscheinungen gemessenen Herzglykosidspiegel im Serum sind deshalb individuell sehr verschieden und weisen eine große Schwankungsbreite auf. Die gemessenen Werte hängen auch von dem gewählten Messverfahren, meist Radioimmunoassay oder Hemmung der ^{86}Rb -Aufnahme, ab.

Bei Smith et al. (1973) finden sich folgende Werte in ng/ml:

	Therapeutische Serumspiegel	Toxische Serumspiegel
Digitoxin	16,60-23,00	34,00-59,00
Digoxin	0,76- 2,40	1,70- 5,70

Forth et al. (1977) geben von weiteren wichtigen Herzglykosiden die therapeutischen Serumspiegel in ng/ml an:

β -Acetyl-Digoxin	1,40
β -Methyl-Digoxin	1,70
Lanatosid C	1,40
Proscillaridin	0,30-0,50
g-Strophanthin	0,60

Die Gefahr der Überdosierung ist bei Herzglykosiden mit großer Lipidlöslichkeit, starker Proteinbindung, langsamem Wirkungseintritt und großer Wirkungsdauer wegen der Trägheit ihrer Wirkungskinetik am größten. Am schwersten zu Handhaben ist deshalb Digitoxin, am leichtesten g-Strophanthin.

4.2 Vergiftungssymptomatik und Diagnostik

Herzglykoside rufen in toxischen Dosen Störungen am Herzen, am Gastrointestinaltrakt und am Nervensystem hervor. Nach Hess (1978) treten in 80-90% der Intoxikationen kardiale Symptome, in 60-70% gastrointestinale und in 10% ophthalmologische und neurologische Erscheinungen auf.

Die kardiotoxischen Wirkungen sind bei Herzgesunden und bei Herzkranken unterschiedlich. Bei ersteren beobachtet man vor allem Vorhof- und AV-Rhythmusstörungen und Überleitungsstörungen. Bei Herzkranken stehen ektopische ventrikuläre Rhythmusstörungen, vor allem Extrasystolen vom Bigeminustyp im Vordergrund. Der Tod tritt in den meisten Fällen durch Kammerflimmern oder Herzstillstand ein.

Die gastrointestinalen Störungen bestehen in Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Leibschmerzen und Durchfall. Sie entstehen vor allem durch die zentral erregenden Wirkungen der Herzglykoside und treten so auch bei parenteraler Verabreichung auf. Doch soll eine lokal reizende Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt, die vor allem bei galenischen Zubereitungen der Herzglykoside auftritt, ebenfalls eine Rolle spielen.

Potter et al. beschreiben 1964 folgende neurotoxische Wirkungen: es sind dies psychische Störungen, Störungen des Gesichtssinnes und allgemeine neurologische Störungen. Die psychischen Störungen traten in Form von Angstlichkeit, Gedächtnisschwund, Erregtheit, Aggressivität, Verwirrtheit und Koma auf.

An Störungen des Gesichtssinnes konnten sie eine vorübergehende Sehschärfeverminderung, Schwachsichtigkeit, Störungen des Farbsehens (nach Forth et al. 1977 des Grün-

Gelb-Sehens), Doppelbilder und wechselnde Skotome beobachten. Die allgemeinen neurologischen Störungen bestanden in Muskelschwäche, Muskelschmerzen und Kopfschmerzen. Nach Forth et al. (1977) sind bei älteren, vorwiegend arteriosklerotischen Patienten auch Aphasien und Halluzinationen beobachtet worden.

Diese Vergiftungssymptomatik findet man grundsätzlich bei beiden Arten der Glykosidintoxikation: bei der iatrogen entstandenen Überdosierung durch schleichende Akkumulation und bei der akuten, massiven Überdosierung, akzidentell oder in homicidaler oder suicidalen Absicht. Allerdings zeigt sich die iatrogene Vergiftung zunächst an den recht uncharakteristischen Symptomen von Seiten des Nervensystems und des Gastrointestinaltraktes (Forth et al.) und wird dann oft übersehen bzw. macht die Bestimmung zumeist des Serumglykosidspiegels notwendig. Die nichterkannte iatrogene Vergiftung mündet dann aber in das Vollbild der Vergiftung ein, wie es bei der akuten Überdosierung plötzlich und massiv auftritt.

In diesem Zusammenhang sollen Doehring et al. (1978) erwähnt werden, die als diagnostisches Hilfsmittel für die Digitalisvergiftung eine gewichtete Check-Liste der klinischen Symptome erstellten. Es gelang den Autoren, 92% der auf Herzglykosidüberdosierung verdächtigen Patienten richtig einzustufen.

Das Vollbild der Vergiftung ist so typisch, daß es kaum übersehen werden kann. Potter et al. (1964) werteten 45 Fälle massiver Überdosierung aus und fanden immer wieder "den Bradycarden, der kotzt", also eine typische Kombination cardialer und gastrointestinaler Symptome. Es sei noch erwähnt, daß auch die cardiale Symptomatik nicht unbedingt eindeutig sein muß; denn Tachycardie bzw.

Bradycardie mit Extrasystolie und verlängerter PQ-Zeit und Absenkung der ST-Strecke im EKG können auch bei Interdigitalisierung und daraufhin sich einstellender Herzinsuffizienz vorkommen.

4.3 Beobachtungen bei massiven Intoxikationen mit Herzglykosiden

a) Häufigkeit

Es ist schwer, die Häufigkeit massiver Herzglykosidintoxikation genauer abzuschätzen, da viele Autoren mehrere Fälle beschrieben, ohne den Zeitraum anzugeben, in welchem sie sich ereigneten.

Als Anhaltspunkt seien einige Quellen angegeben:

Potter et al. (1964) berichten von 45 eigenen Beobachtungen. Sie verweisen auch auf 20 Berichte von 29 Fällen, die in der Zeit von 1926-1960 veröffentlicht wurden. Wir selbst fanden 10 Veröffentlichungen über 43 Fälle aus dem Zeitraum von 1954-1976. Autoren waren Asplund et al. (1971), Bachmann (1960), Bergy et al. (1957), Brandes et al. (1954), Buchanan (1967), Chan et al. (1976), Fisher (1962), Hagemeijer (1976), Heesen et al. (1975) und Sybirska et al. (1969).

Es wurde durchschnittlich von zwei als eindeutig diagnostizierten Fällen pro Jahr berichtet. Man kann deshalb nicht behaupten, daß massive Intoxikationen mit Herzglykosiden zu den häufigen Vergiftungen gehören. Anders gilt es dagegen für die iatrogenen Digitalisvergiftungen, die, wie schon erwähnt, weit verbreitet sind. Smith et al. (1973) geben in ihrem Überblick sogar noch höhere Prozentzahlen als Forth et al. (1977) an.

Nach Smith sollen 8-35% der Patienten intoxikiert sein. Hess (1978) schätzt den Anteil der intoxikierten Patienten auf 10-20%.

b) Dosen

Pebay-Peyroula et al. berichteten im Jahre 1971 von einigen Vergiftungen mit Herzglykosiden. In 14 Fällen war Digitoxin in Dosen von 3-15 mg eingenommen worden. Zwei dieser Patienten verstarben an Dosen von je 10 mg. Es waren dies zwei Frauen im Alter von 50 und 87 Jahren. Die 83-jährige hatte ein schon vorgeschädigtes Herz. Dieselbe Dosis wurde jedoch von drei anderen Patienten noch überlebt. Die höchste Dosis von 15 mg wurde von einer 48-jährigen Frau mit gesundem Herzen eingenommen und überlebt. Potter et al. veröffentlichten (1964) über aufgenommene Dosen in Höhe von 1,5-20 mg Digitoxin. Die Dosis von 20 mg führte nicht zum Tode. Einige wesentlich geringere Dosen jedoch brachten schon vorgeschädigte Patienten zu Tode.

Nach Pebay-Peyroula et al. (1971) wurden Dosen von Lanatosid C in Höhe von 20, 25 und 30 mg ertragen, während nach Mitteilung von Lukkari et al. (1965) ein dreijähriges Kind an der Einnahme von 5 mg Lanatosid C verstarb. Asplund et al. meldeten 1971 einen Todesfall durch Aufnahme von 10 mg Digoxin und die Genesung dreier Patienten nach Aufnahme von 12,5, 15 und 24 mg Digoxin.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Grenzdosen:

kleinste tödliche Dosis

Digitoxin	3,0 mg <u>Potter et al.</u> (1964)
Digoxin	10,0 mg <u>Asplund et al.</u> (1971)
Lanatosid C	5,0 mg <u>Lukkari et al.</u> (1965)

größte nichttödliche Dosis

Digitoxin	20,0 mg <u>Potter et al.</u> (1964)
Digoxin	24,0 mg <u>Asplund et al.</u> (1971)
Lanatosid C	30,0 mg <u>Pebay-Peyroula et al.</u> (1971)

Der Vollständigkeit halber soll die dosis letalis wichtiger Herzglykoside nach Forth et al. (1977) angegeben werden. Sie wurde durch i.v. Applikation der Herzglykoside an Katzen ermittelt (in mg/kg):

Digitoxin	0,400
Digoxin	0,280
B-Methyl-Digoxin	0,241
B-Acetyl-Digoxin	0,385
Lanatosid C	0,280
Droscillaridin	0,170
g-Strophantin	0,120

c) Prognose

Die Wahrscheinlichkeit eine Herzglykosidvergiftung zu überleben ist, unter gewissen Voraussetzungen, recht gut. Nur ein geringer Teil der veröffentlichten Fälle massiver Vergiftung endeten tödlich. Bei allen Fällen mit tödlichem Ausgang kamen zur hohen Herzglykosiddosis noch andere belastende Faktoren hinzu, während Patienten ohne Belastungsfaktoren erstaunlich hohe Dosen überlebten.

Belastungsfaktoren waren: chronischer Alkoholismus, die Aufnahme zusätzlicher Gifte, Herzinsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen in der Anamnese. So erklärt sich auch die hohe Letalität in Fällen therapiebedingter Überdosierung, da in solchen Fällen das Herz schon vorgeschädigt ist. Smith et al. (1973) sprechen von einer Letalität zwischen 3-21%, während Hess (1978) die Letalität auf 5-10% schätzt.

Ein weiterer, für die Prognose wichtiger Parameter ist nach Kuschinsky et al. (1974) die Funktion der Niere, da diese das Hauptausscheidungsorgan für die meisten Herzglykoside und ihre Metaboliten ist. Eine Niereninsuffizienz führt daher fast immer zu einer verzögerten Elimination und damit zu höheren Plasmaspiegeln. Letztendlich ist die Therapie für den Ausgang einer Vergiftung entscheidend und auch erfolgversprechend, weil man gerade die cardiale Symptomatik, die meist zum Tode führt, durch geeignete Maßnahmen gut beherrschen kann. Therapeutische Erfahrungen bei der Behandlung von Vergiftungsfällen werden von Brandes et al. (1954), Bachmann (1960), Thomopoulos et al. (1965), Buchanan (1967), Hagemeyer (1976), Heesen et al. (1975) und Chan et al. (1976) mitgeteilt. Die Therapie war nicht ohne Schwierigkeiten und erforderte einigen Aufwand. Doch ist der hohe Aufwand angesichts der guten Erfolgsaussichten sicher gerechtfertigt.

5. Therapie der Vergiftungen

Bei extracardialen Symptomen und bei leichten Herzercheinungen genügt es , das Medikament eine zeitlang abzusetzen und dann mit kleineren Dosen weiter zu behandeln (Forth et al., 1977). Grundsätzlich muß der Elektrolythaushalt überwacht werden wegen der synergistischen Wirkung von Hypokaliämie und Hypercalcämie auf die Digitaliswirkung. Nach Heesen et al. (1975) können hohe Dosen der Glykoside sogar einen Sturz von Natrium und Kalium im Serum durch rever-

sible Schädigung der Nierentubuli auslösen und dadurch zum Herztod führen.

Bei bradycarden Rhythmusstörungen wie Sinusbradycardie und Sinusknotenstillstand oder AV-Block II. und III. Grades gibt man Atropin und β -Sympathomimetika. Versagen diese Medikamente, so wird die Implantation eines Herzschrittmachers unumgänglich sein (Forth et al. 1977).

Tachycarde Rhythmusstörungen werden dagegen in erster Linie medikamentös behandelt. Nur im Notfall, wie beim Kammerflimmern gebraucht man die Elektrotherapie. Die Defibrillation sollte unter Phenytoinschutz stattfinden. Bei supraventrikulären und ventrikulären Tachycardien und Ektopien kann Kalium i.v. versucht werden, auch im Fall einer Normokalämie. Bei Hyperkalämie und AV-Block, vom Block bei supraventrikulärer Tachycardie abgesehen, ist Kaliumgabe kontraindiziert (Fülgraff et al., 1977). In allen Fällen der Tachyarrhythmien hat man mit der Gabe der Antiarrhythmica Phenytoin oder Lidocain schon gute Ergebnisse erzielt (Smith et al., 1973). Beide haben einen stabilisierenden Effekt auf die Membranen, ohne den positiv inotropen Effekt der Herzglykoside wesentlich zu schwächen. Aus der Reihe der Antiarrhythmica kommen Chinidin und Procainamid erst in zweiter Linie in Frage, desgleichen der β -Rezeptorenblocker Propanolol (Smith et al., 1973).

Aufgrund der Tetaniegefahr wird für die Verringerung der Calciumionenkonzentration mit dem Chelatbildner Na-EDTA äußerste Vorsicht empfohlen (Forth et al., 1977). Eine Möglichkeit speziell den Digitoxinspiegel zu senken besteht darin, in den Darm ausgeschiedenes Glykosid, welches einen ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf durchläuft, bzw. seine Metaboliten mit medizinischer Kohle

oder Cholestyramin zu binden. Ein solcher Versuch ist bei allen lang wirkenden Herzglykosiden angebracht, da diese einen enterohepatischen Kreislauf durchlaufen. Über die bemerkenswerte Wirksamkeit dieser Therapie berichten Bazzano et al. (1972). Unter Einsatz des Anionenaustauschers Colestipol konnte die Plasmahalbwertszeit von Digitoxin von 9,3 Tagen auf 2,75 Tage gesenkt werden.

Als weitere Möglichkeit, den Glykosidspiegel in den Geweben zu senken, stellen Heesen et al. (1975) das Verfahren der Plasmapherese (= Austausch des Blutplasma) zur Diskussion.

Die Eliminierung von Digoxin bei einem schweren Vergiftungsfall durch Aufnahme von 22,5 mg des Glykosids gelang Smith et al. (1976) mit Hilfe von Fragmenten von Schafsantikörpern gegen Digoxin. Sie wurden in einer Dosis von 1100 mg durch Infusion zugeführt. Zehn Minuten nach Ende der Infusion stellte sich ein Sinusrhythmus wieder ein, nachdem vorher Vorhofflimmern mit hochgradigem AV-Block und Bradyarrhythmie bestanden hatte. Es traten weder Überempfindlichkeitssymptome auf, noch fanden sich im Serum Anti-Antikörper.

Bei Tachykardien und Arrhythmien kontraindiziert sind alle Pharmaka, die positiv chronotrop wirken oder solche, die die ektopische Reizbildung fördern, so etwa Calcium, Sympathomimetika und Methylxanthine wie Coffein oder Theophyllin. Alle Stoffe, die den Blutkaliumspiegel senken könnten, wie manche Diuretika oder größere Glukosemengen, dürfen nur vorsichtig gegeben werden (Füllgraff et al., 1977).

Werden große Mengen der Herzglykoside akzidentell oder in suizidaler Absicht aufgenommen, so wird zusätzlich zu den oben angegebenen Maßnahmen die Magenspülung mit medi-

zinischer Aschle und Natriumsulfat empfohlen (Kuschinsky et al., 1977). Diese Maßnahme dürfte jedoch oft zu spät kommen, da nach Kisser (1969) die Symptome einer Digitalisintoxikation oft erst Stunden nach der Giftaufnahme auftreten, zu einem Zeitpunkt, da schon der überwiegende Anteil der Substanzen aus dem Magendarmtrakt resorbiert worden ist.

6. Zusammenstellung von Bestimmungsmethoden für Herzglykoside in biologischem Material

6.1 Extraktion

Die Bestimmung von Substanzen in biologischem Material erfolgt in zwei Schritten. Zunächst müssen sie isoliert werden, dann kann man sie qualitativ nachweisen oder quantitativ bestimmen.

Bei der Isolierung wird mit einem geeigneten Lösungsmittel eine größere Stoffgruppe aus dem Untersuchungsmaterial herausgelöst. Die entstandene Lösung bedarf noch feinerer Auftrennung. Eine dafür gut geeignete Methode ist die Chromatographie. Vor der Chromatographie jedoch können die Substanzen des Rohextraktes durch Ausschütteln mit weiteren Lösungsmitteln noch feiner aufgetrennt werden. Für die Extraktion der Herzglykoside aus pflanzlichem oder tierischem Material gibt es eine Reihe geeigneter Lösungsmittel:

Wasser, Äthanol, Methanol, Äthanol- Wasser- Mischungen, Methanol- Wasser- Mischungen, Chloroform.

Sie kommen je nach dem Glykosid, das in dem Material vermutet wird, zur Anwendung.

Da sich einige wichtige Herzglykoside nach Angaben von Müller et al. (1976) in Chloroform mehr oder weniger gut lösen, ist die Verwendung dieses Lösungsmittels angezeigt, wenn man das im Untersuchungsmaterial zu erwartende Herzglykosid nicht kennt. Sonanini (1964) benutzte als weithin anwendbares Lösungsmittel für eine Reihe von Herzglykosiden die Mischung Chloroform-Methanol=1:1. Für sehr schonende Extraktionen kleiner Glykosidmengen mit Hilfe von Methylenchlorid bei Raumtemperatur empfiehlt Pötter (1961) einen Vakuumperforator. Dieser arbeitet bei vermindertem Druck. Einen weiteren Extraktionsapparat für die kontinuierliche Extraktion unter reduziertem Druck mit Athanol oder anderen Lösungsmitteln beschreiben Curry et al. (1960). Curry et al. (1960) liessen das im Rahmen einer Herglykosidextraktion als Lösungsmittel verwendete Chloroform unter normalem Druck bei 63°C verdampfen. Die hohe Wiederauffindungsrate des zugesetzten Herzglykosids beweist, daß es durch diese Temperatur kaum angegriffen wurde.

6.2 Chromatographische Auftrennung

Für die Feintrennung und Reinigung von herzoglykosidhaltigen Extrakten wird Säulenchromatographie, Papierchromatographie oder Dünnschichtchromatographie verwendet. Von den Arbeiten über die Trennung herzoglykosidhaltiger Extrakte durch Säulenchromatographie seien einige erwähnt. An einer mit Aluminiumoxid gefüllten Chromatografiesäule reinigte z. B. Repke (1958) einen Glycosidextrakt aus tierischem Material. Auch Pfordte et al.

(1970) fanden die Säulenchromatographie an Aluminium-oxid brauchbar für die Trennung von Herzglykosiden. Grade et al. (1967) erzielten mit Säulenchromatographie an Sephadex G 200 gute Ergebnisse. Diese Art der Chromatographie erfordert zwar einen hohen Aufwand an Zeit und Lösungsmitteln, ermöglicht jedoch die Auftrennung großer Mengen.

Papier- und Dünnschichtchromatographie haben sich nach Macek et al. (1972) bei der Isolierung und Identifizierung herzaktiver Glykoside bestens bewährt. So sind die Erfolge der Forschung der letzten Jahrzehnte nicht zuletzt den Vorzügen dieser beiden Methoden zu verdanken. Jedoch erfordert die Papierchromatographie verglichen mit der Dünnschichtchromatographie einen relativ hohen Zeitaufwand und bewältigt dabei nur kleine Mengen einer Analysenlösung. Die Dünnschichtchromatographie braucht dagegen wenig Zeit, bewältigt große und kleine Substanzmengen, benötigt wenig Lösungsmittel und liefert gute Trennergebnisse. Sie ist im Prinzip der Säulenchromatographie gleich, nur ist bei ihr das Sorptionsmittel auf einer Platte ausgebreitet, anstatt in einer Säule eingeschlossen zu sein. Die robusten mineralischen Sorptionsmittel erlauben die Anwendung aggressiver Reagenzien, welche noch sehr geringe Substanzmengen nachweisen können. So können noch geringere Substanzmengen als bei der Papierchromatographie nachgewiesen werden.

In der Literatur wird über eine große Zahl von Fließmittel-Sorptionsmittel-Kombinationen berichtet. an dieser Stelle sollen einige der Kombinationen festgehalten werden, die Mischungen der verschiedensten Herzglykoside noch differenzieren können.

Nach Macek et al. (1972) können

Digitoxin, Digitoxigenin, Digoxin, Digoxigenin,
Lanatosid C, Scilla- und Stophantusglykoside

durch

Essigester - Pyridin = 9 : 1 mit 2,7% Wasser
auf Kieselgel 60

Methyläthylketon mit 5,4% Wasser
auf Kieselgel 60

Toluol - Essigester - n-Propanolol = 20 : 66 : 14
mit 2,2% Wasser auf Kieselgel 60

getrennt werden. Nähere Ausführungsvorschriften werden
nicht angegeben.

Nach James et al. (1964) können

Digitoxin, Digoxin, β -Acetyl-Digoxin, Lanatosid C
und andere Herzglykoside

durch

Methylenchlorid - Methanol - Wasser = 84 : 15 : 1
auf Silicagel

Chloroform - Pyridin = 6 : 1
auf Silicagel

getrennt werden. Bei der Auftrennung betrug die Steig-
höhe des Fließmittels 13cm.

Nach Wang (1977) können

Digitoxin, Digoxin, Lanatosid C und andere Glykoside
durch

Essigester - Methanol - Wasser = 16 : 2 : 1
auf Kieselgel 60

Methylenchlorid - Methanol - Formamid = 80 : 19 : 1
auf Kieselgel 60

getrennt werden. Nähere Ausführungsvorschriften werden
nicht angegeben.

Nach Bancher (1977) können

Digitoxin, Digoxin, Digoxigenin, Lanatosid C
und Lanatosid A

durch

Methylenchlorid - Methanol - Essigsäure = 90 : 14 : 0,5
auf Kieselgel 60 Fertigplatten der Firma Merck

getrennt werden. Nähere Ausführungsvorschriften werden
nicht angegeben.

Die Eignung von 27 verschiedenen Trennsystemen für
Herzglykoside prüfte Boisio (1972) in einer umfang-
reichen Arbeit.

6.3 Qualitativer Nachweis mit Sprühreagenzien

Im Anschluß an die dünnschichtchromatographische Isolierung werden chemische Nachweismethoden angewandt. Die getrennten Substanzen werden mit Hilfe von Reagenzien in gefärbte Verbindungen übergeführt. Streng genommen werden dabei nur bestimmte chemische Strukturen nachgewiesen und nicht die Substanzen selbst. Auch die R_f -Werte geben wegen ihrer relativ schlechten Reproduzierbarkeit nur Hinweise. So müssen auf der Dünnschichtplatte in der Regel bekannte Vergleichssubstanzen mitgeführt werden, um unbekannte Stoffe nachzuweisen.

Die Reagenzien für Herzglykoside lassen sich in drei Gruppen einteilen:

- a) Reagenzien mit verschiedenen Angriffspunkten
(Angriff am Steroidgerüst und am Zucker)
- b) Reagenzien die den Lactonring angreifen
- c) Reagenzien die den Zuckeranteil angreifen

Gruppe a der Reagenzien:

Vertreter dieser Gruppe sind aggressive Säuren und Oxydationsmittel. Diese bewirken an Steroidgerüst und Zucker Oxydationen und Dehydrierungen. Nach dem Erhitzen ergeben diese Reagenzien im Tageslicht sichtbare Farbflecken und im UV-Licht sichtbare Fluoreszenzen. Nach Habermann et al. (1953) ändert sich die Intensität der Fluoreszenzen während des Erhitzens. Deshalb sollte man bei der Nachbehandlung vorsichtig sein und die Chromatogramme beim Erhitzen immer wieder betrachten, um den Augenblick der optimalen Fluoreszenz nicht zu

versäumen. Bei zu starkem Erhitzen verkohlen alle organischen Substanzen und treten dann als schwarze Flecken hervor. Es ist dies auch eine Möglichkeit, die Herzglykoside auf dem Chromatogramm zu lokalisieren und zu identifizieren. Vertreter dieser Gruppe von Sprühreagenzien sind:

Trichloressigsäure - Reagenz

Zusammensetzung:

In der Literatur werden verschiedene Lösungsmittel und Säurekonzentrationen angegeben. Gebräuchlich sind:
eine 25% ige Lösung von Trichloressigsäure in Athanol,
eine 20 - 25% ige Lösung von Trichloressigsäure in Chloroform,
eine 33% ige Lösung von Trichloressigsäure in Chloroform, wobei pro 10ml der Lösung ein Tropfen konzentriertes Wasserstoffperoxid zugesetzt wird.

Nachbehandlung:

Die besprühten Platten werden 5min bei 110°C erhitzt.

Nachweisgrenze:

Nach Jensen (1953) können von den Herzglykosiden
5 - 10µg im Tageslicht und 0,25 - 0,50µg im UV-Licht
erfaßt werden.

Trichloressigsäure - Chloramin - Reagenz

Zusammensetzung:

Pötter (1972) verwendet eine Mischung von 30 Teilen
38% iger Trichloressigsäurelösung in Chloroform mit
einem Teil 2% iger äthanolischer Chloraminlösung.

Nachbehandlung:

Die besprühten Platten werden 10min bei 120°C erhitzt.

Nachweisgrenze:

Nach Neher (1964) liegt die Nachweisgrenze bei 0,10µg im Tageslicht und bei 0,01µg im UV-Licht. Nach Jensen (1953) können im UV-Licht lediglich 0,50µg sichtbar gemacht werden.

Schwefelsäure - Reagenz

Zusammensetzung:

Es ist dies ein häufig gebrauchtes Reagenz. Zur Anwendung kommt nach Neher (1964) eine konzentrierte oder eine 50% ige, wässrige Schwefelsäure oder eine Mischung aus gleichen Teilen konzentrierter Schwefelsäure und Äthanol.

Nachbehandlung:

Man erhitzt 5 - 20min auf 100 - 110°C.

Nachweisgrenze:

Im UV-Licht sollen noch 0,01µg der Herzglykoside sichtbar sein.

Salzsäure - Reagenz

Zusammensetzung:

Hoeke et al. (1969) verwendeten als Reagenz HCl -
- Dampf.

Anwendung:

Nach der Entwicklung werden die luftgetrockneten Platten ungefähr 5min bei 110°C erwärmt und noch warm für 5min

in eine mit HCl-Dampf gesättigte Atmosphäre gestellt.

Nachbehandlung:

Die Platten werden nochmals auf 110°C erhitzt.

Nachweisgrenze:

Die Nachweisgrenze liegt bei 0,05µg im UV-Licht.

Phosphorsäure - Reagenz

Zusammensetzung:

Nach Stahl et al. (1967) werden gleiche Teile konzentrierter Phosphorsäure und Wasser gemischt.

Anwendung:

Man muß die Platte solange besprühen, bis sie durchsichtig feucht ist.

Nachbehandlung:

Es wird 10 - 20min bei 120°C erhitzt. Der Nachweis soll empfindlicher werden, wenn man nach 10min Erhitzen die Platte zusätzlich mit einer Lösung von 1,5g Phosphomolybdänsäure in 100ml Äthanol besprüht und anschließend 2 - 5min erhitzt.

Nachweisgrenze:

Sie liegt bei ungefähr 0,5µg im UV-Licht.

Zur Gruppe a der Reagenzien gehören auch Mischungen von Säuren mit aromatischen Aldehyden. Der Zusatz aromatischer Aldehyde soll die Empfindlichkeit der Reagenzien verstärken. Gebräuchliche Reagenzien sind:

Vanillin - Phosphorsäure - Reagenz

Zusammensetzung:

Nach Stahl et al. (1967) löst man 1g Vanillin in 100ml 50% iger, wässriger Phosphorsäure.

Nachbehandlung:

Die Platten werden 10 - 20min bei 120°C erhitzt.

Nachweisgrenze:

Die Nachweisgrenze dieses Reagenz war in der Literatur nicht angegeben.

p - Anisaldehyd -Säure - Reagenz

Zusammensetzung:

Nach Stahl et al. (1967) wird eine Mischung von 0,5ml p - Anisaldehyd, 50ml Eisessig und 1ml Schwefelsäure verwendet. Die Modifikation nach Sjöholm (1962) ist aus 0,5ml p - Anisaldehyd, 5,0ml Perchlorsäure, 10ml Azeton und 40ml Wasser zusammengesetzt.

Nachbehandlung:

Das Reagenz nach Stahl erfordert 5 - 10min langes Erhitzen bei 100 - 110°C, Sjöholm empfiehlt 4 - 5min bei 75 - 80 °C zu erhitzen.

Nachweisgrenze:

Sie liegt für das Reagenz nach Sjöholm bei 0,1 - 0,2µg in Tageslicht und bei 0,02µg in UV-Licht.

Zur Gruppe a gehört auch wegen seines Angriffs an verschiedenen Stellen im Molekül das Antimontrichlorid-reagenz. Es soll zu den am häufigsten benutzten beim

Nachweis von Steroiden gehören. Nach Habermann et al. (1953) reagiert es mit sämtlichen Steroiden und liefert leuchtendere und nuancenreichere Farben als andere Reagenzien.

Antimontrichlorid - Reagenz

Zusammensetzung:

Neher (1964) empfiehlt eine gesättigte Chloroformlösung oder eine nur 20 - 30% ige Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform. Sonanini (1964) verwendete eine 50% ige Lösung von Antimontrichlorid in Eisessig.

Nachbehandlung:

Bei beiden Reagenzien werden die Platten 5min auf 100 - 120°C erhitzt.

Nachweisgrenze:

Nach Neher liegt sie bei 0,5µg in UV-Licht. Sonanini gibt für Tageslicht 0,2µg, für UV-Licht 0,01µg an.

Zur Gruppe b , der Gruppe von Reagenzien die den Lactonring angreifen, gehören folgende Reagenzien:

m - Dinitrobenzol - Alkali - (Raymond) - Reagenz

Zusammensetzung:

Bei der Anwendung von Raymonds - Reagenz müssen die Chromatogramme mit zwei verschiedenen Lösungen besprüht werden. Neher (1964) gibt an, daß das Ergebnis besser werden kann, wenn die Alkali - Lösung zuerst aufgesprüht wird. Doch wird in der Regel die m - Dinitro-

benzol haltige Lösung als erste angewandt.

Folgende Reagenzienkombinationen sind gebräuchlich:

1. Spray	2. Spray
2,5% ige DNB - Lösung	5% ige KOH - Lösung
in Chloroform	in Methanol
oder	oder
10% ige DNB - Lösung	6g NaOH
in Benzol	in 25ml Wasser und 25ml Methanol

Man kann die Chromatogramme auch ein einziges Mal mit folgender Lösung besprühen:

2% ige m - Dinitrobenzol - Lösung in Athanol wird mit dem gleichen Volumen 30% iger, wässriger Kalilauge gemischt.

Nachbehandlung:

Die Farbflecken erscheinen ohne Nachbehandlung.

Nachweisgrenze:

Nach Neher (1964) liegt die Nachweisgrenze im Tageslicht bei 2 - 5µg. Nach White et al. (1966) sollen im Tageslicht noch 7,4µg der Glykoside gut sichtbar sein.

Nitroprussidnatrium - (Legal) - Reagenz

Zusammensetzung:

Nach Stahl et al. (1967) wird eine 1% ige Nitroprussidnatriumlösung in einer 1 n Lösung von NaOH in 50% igem, wässrigen Äthanol hergestellt.

Nachbehandlung:

Eine Nachbehandlung ist unnötig.

Nachweisgrenze:

Jensen (1953) gibt als Nachweisgrenze im Tageslicht 5 μ g an.

3,5 - Dinitrobenzoesäure - (Keddes) - Reagenz

Zusammensetzung:

Zur Anwendung gelangt eine 1% ige Lösung von 3,5 - Dinitrobenzoesäure in Methanol, der kurz vor dem Besprühen das gleiche Volumen einer 1 n KOH - Lösung in Methanol zugesetzt wird (Kisser, 1969).

Nachbehandlung:

Das Sprühreagenz färbt ohne weiteres Zutun.

Nachweisgrenze:

Nach Kisser (1969) ist im Tageslicht noch 1 μ g der Herzglykoside sichtbar.

Pikrinsäure - (Baljet) - Reagenz

Zusammensetzung:

Zur Anwendung nach Stahl et al. (1967) gelangt eine 1% ige Pikrinsäurelösung in Äthanol.

Jensen (1953) mischt gleiche Volumina einer 2,5% igen äthanolischen Pikrinsäurelösung und einer 15% igen Lösung von NaOH in einem Gemisch von Wasser - Äthanol = 1 : 1.

Nachbehandlung:

Bei der Anwendung nach Stahl wird die Platte nach Besprühen mit Pikrinsäurelösung bei Raumtemperatur getrocknet und mit einer 5% igen, äthanolischen KOH - Lösung zusätzlich besprüht.

Nachweisgrenze:

Nach Jensen liegt die Nachweisgrenze im Tageslicht bei 5µg.

Keller - Kiliani - Reagenz

Zusammensetzung:

El - Olemy et al. (1975) geben zu 20ml konzentrierter Essigsäure 2ml einer 5% igen, wässrigen FeCl_3 - Lösung.

Nachbehandlung:

Man muß 5min bei 100°C erhitzen.

Nachweisgrenze:

Die Nachweisgrenze dieses Reagenz wurde von den Autoren nicht angegeben.

Die Reagenzien der Gruppe c , der Gruppe von Reagenzien die mit dem Zuckeranteil der Herzglykoside reagieren, sind am spezifischsten von allen Reagenzien, da 2 - Desoxyzucker, mit welchen sie eigentlich reagieren, in der Natur vor allem bei den Herzglykosiden vorkommen. Von den Reagenzien dieser Gruppe wird fast nur das Xanthhydrolreagenz benutzt. Es dient in erster Linie der quantitativen Bestimmung der Herzglykoside (Zusammensetzung und Anwendung s. unter 6. 4. 2). Auch das Keller - Kiliani - Reagenz ist nicht nur für den Lactonring, sondern auch für 2 - Desoxyzucker spezifisch.

Eine umfassende Zusammenstellung von Nachweisreagenzien und ihrer Angriffspunkte findet sich auch bei Frèrejaques et al. (1963).

6.4 Quantitativer Nachweis der Herzglykoside

6.4.1 Densitometrie

Die Substanzmenge auf dem Chromatogramm kann mit Hilfe der Densitometrie in situ bestimmt werden. Diese Methode besteht in der Abschätzung der Fleckengröße und / oder der Farb - bzw. der Fluoreszenzintensität. Sie kann mit einem Densitometer, durch Planimetrieren oder durch visuellen Vergleich vorgenommen werden. In jedem Fall handelt es sich um eine halbquantitative Auswertung, die jedoch einfach und schnell ist. Sie beruht auf der Annahme, daß Fleckengröße bzw. Farbintensität der Substanzmenge proportional sind. In der Praxis trägt man auf der Platte neben der Analysenlösung möglichst viele Lösungen mit bekanntem Substanzgehalt auf. Nach dem Entwickeln und Anfärben wird die Fläche und die Farb - oder Fluoreszenzintensität der Flecken verglichen. Die genaueste Bestimmung erzielt man, wenn man eine Eichkurve aufstellt. Zu diesem Zweck muß man die bekannten Substanzmengen gegen die entsprechenden Fleckenflächen auftragen. Die Fleckenfläche der unbekannten Substanz ergibt dann über die Kurve eine bestimmte Substanzmenge. Nach Stahl et al. (1967) sind die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse bei Papierchromatographie oft sehr genau, dagegen weniger genau bei der Dünnschichtchromatographie, da hier ab einer bestimmten Substanzmenge die Fleckengröße nicht mehr streng proportional zunimmt. Man erlangt bei der Dünnschichtchromatographie genaue Ergebnisse nur, wenn weniger als 5µg der Substanz aufgetragen werden. Größere Mengen ergeben nur noch ganz geringe Größenunterschiede der Flecken.

Die Densitometrie wurde von Lemli (1962) für die Bestimmung von Herzglykosiden aus Digitalisblättern benutzt. Zur Detektion verwendete er Antimontrichloridreagenz.

6.4.2 Spektrophotometrie

Zu diesem Zweck wird die herzoglykosidhaltige Sorptionsmittelschicht von der Platte abgeschabt und das Glykosid mit einem geeigneten Lösungsmittel oder dem Reagenz selbst eluiert. Das Reagenz bildet mit dem Glykosid einen Farbstoff, der Licht bestimmter Wellenlänge absorbiert. Aus der gemessenen Extinktion wird die Konzentration des Glykosids entweder mit Hilfe eines Standards berechnet oder über eine Eichkurve bestimmt. Manche, durch Sprühreagenzien entstandene Farbstoffe können ebenfalls eluiert und ihre Konzentration spektrophotometrisch bestimmt werden. Doch ist dieses Verfahren nicht exakt, denn die Reaktionsabläufe auf der Platte sind, wegen der unterschiedlichen Beladung des Substanzflecks mit Reagenz, unterschiedlich. Ausserdem werden die Farbstoffe aus dem Sorptionsmittel nicht so völlig eluiert wie die unveränderten Glykoside. Für die genaue quantitative Bestimmung ist also die Elution der Glykoside vom Sorptionsmittel notwendig. Deshalb braucht man Verfahren zur Lokalisierung der Herzglykoside, ohne sie zu verändern. Eine Möglichkeit besteht darin, zwei Analysenlösungen aufzutragen und während des Besprühens eine der beiden Laufstrecken abzudecken. Der Fleck auf der nicht besprühten Laufstrecke, der im R_f -Bereich der zu bestimmenden Substanz liegt, wird abgeschabt. Der Nachweis größerer Glykosidmengen gelingt auch mit folgenden zwei Verfahren:

Man kann die Platten vorsichtig mit Wasser besprühen bis der Untergrund transparent geworden ist. Die Glykoside, als wenig wasserlösliche Substanzen, treten als weiße, undurchsichtige Flecken hervor. Jelliffe et al. (1966) verwendeten dieses Verfahren und konnten damit noch Glykosidmengen zwischen 10 - 20µg auf Silicagel G lokalisieren.

Zur Kennzeichnung organischer Verbindungen eignet sich auch sehr gut Jod. Es lagert sich reversibel an solche Moleküle an. Die entstandenen Komplexe zerfallen schnell. Pötter et al. (1972) besprühten Herzglykoside auf Kieselgelplatten mit einer 1% igen Jodlösung in Chloroform - Methanol = 1 : 1. Die sich ergebenden braunen Flecken wurden markiert und das Jod durch einen heißen Luftstrom vertrieben.

Das gebräuchlichste Reagenz zum spektrophotometrischen Nachweis der Herzglykoside ist das Xanthhydrolreagenz. An dieser Stelle soll seine Anwendung nach Jelliffe et al. (1966) angegeben werden.

Xanthhydrolreagenz

Zusammensetzung:

Nach Jelliffe et al. (1966) werden 30mg Xanthhydrol in 100ml Eisessig gelöst. Dieser Lösung setzt man 1ml konzentrierte HCl zu.

Anwendung:

Das abgeschabte, glykosidhaltige Sorptionsmittel wird mit 5ml des Reagenz kräftig geschüttelt. Dann wird der Ansatz für 3min in ein kochendes Wasserbad gestellt und anschließend 5min in Eiswasser. Das Sorptionsmittel wird bei 2000U abzentrifugiert und der Überstand sofort gegen

einen Leerwert bei 550nm gemessen. Die Bestimmung der Glykosidmenge erfolgt mit Hilfe einer Standardlösung, wobei man beachten muß, daß das Lambert - Beersche Gesetz nur im Konzentrationsbereich von weniger als 50µg Glykosid / 5ml Reagenz gilt.

Für die photometrische Bestimmung der Herzglykoside verwendete auch Pötter (1963) deren Farbreaktion mit Xanthydrol. Er eluierte jedoch das glykosidhaltige Sorptionsmittel nicht mit dem Reagenz selbst, sondern mit Methanol.

Noch bessere Ergebnisse als das Xanthydrol - Reagenz soll nach Pötter (1965) die Farbreaktion mit Dixanthylnharnstoff ergeben.

Dixanthylnharnstoffreagenz

Zusammensetzung:

Nach Pötter et al. (1972) werden 10mg Dixanthylnharnstoff in 100ml Eisessig gelöst und tropfenweise mit 1ml HCl versetzt.

Anwendung:

Das aus der Glykosidzone abgeschabte Sorptionsmittel wird zu 10ml Reagenz gegeben und 20min im Wasserbad von 60°C erhitzt. Nach 3min langem Abkühlen in Eiswasser wird der Ansatz filtriert. Man setzt dem Filtrat einen Tropfen Natriumthiosulfatlösung zu, denn dadurch bleibt die Extinktion 4h stabil. Das Lambert - Beersche Gesetz gilt bei Messung von primären Glykosiden im Bereich von 20 - 120µg und bei Messung von Sekundärglykosiden im Bereich von 10 - 60µg, jedesmal pro 10ml des Reagenz.

Die photometrische Bestimmung der Herzglykoside gelingt auch mit Reagenzien, die am Lactonring angreifen. Rowson (1952, 1955) arbeitete Verfahren für den Einsatz von Baljet-, Raymonds- und Keddes- Reagenz aus. Auch die Keller - Kiliani - Reaktion, die spezifisch für den Lactonring und 2-Desoxyzucker ist, kommt bei Rowson zur Anwendung. Diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, daß nicht so geringe Mengen der Herzglykoside quantitativ bestimmt werden können wie mit dem Xanthydrol- oder dem Dixanthylharnstoffreagenz.

6.4.3 Enzymhemmungstest

Eine der heutigen Standardmethoden für die Herzglykosidbestimmung im Serum beruht auf ihrer Eigenschaft, die ^{86}Rb - Aufnahme der Erythrozyten zu hemmen. Die Herzglykoside vermindern die Aktivität der Na - K - ATP ase, welche die Energie für den Transport der Kationen liefert. ^{86}Rb wird wie Kalium aktiv transportiert und unter Herzglykosideinwirkung ebenfalls vermindert durch die Zellmembran geschleust. Die Bestimmung wird durchgeführt, indem das Serum des Patienten mit einer Standardlösung menschlicher Erythrozyten inkubiert und die ^{86}Rb - Aufnahme gemessen wird. Mit Hilfe bekannter Glykosidmengen kann man eine Eichkurve erstellen und die unbekannte Konzentration daran ablesen.

Lowenstein (1966) modifizierte das Verfahren, indem er die Herzglykoside mit Methylenchlorid vorextrahierte. Es soll dadurch weniger störanfällig sein und bietet die Möglichkeit, andere Gewebe und Flüssigkeiten außer Serum zu untersuchen, da diese als solche die Erythrozyten der Standardlösung hämolysieren würden.

Gjerdrum (1970) verfeinerte das Verfahren Lowensteins. Burnett et al. (1968) isolierten die Na - K - ATP ase und bestimmten ihre Hemmung an der verminderten Freisetzung von Phosphor. Auch Bertler et al. (1970) und Medzirhadsky et al. (1971) arbeiteten mit dem isolierten Enzym. Eine weitere interessante Möglichkeit, die Aktivität der Na - K - ATP ase zu messen ist nach Wessels et al. (1974) die Bestimmung der Erythrozytenelektrolyte. Die Autoren fanden bei Patienten mit Zeichen von Herzglykosidintoxikation im Vergleich zu Patienten ohne Intoxikationserscheinungen eine deutliche Abnahme der K - Konzentration sowie eine starke Zunahme des Natriumgehaltes und des Na - K - Quotienten der Erythrozyten. Nach Swanson et al. (1974) sollen auch die Kalzium- und die Kaliumkonzentrationen des Speichels Anhaltspunkte für das Vorliegen einer Digitalisintoxikation geben. Diese beiden, relativ einfach durchzuführenden Verfahren haben sich jedoch noch nicht als Standardmethoden durchsetzen können. Eine Übersichtsarbeit zum Thema " Hemmung der Membran - ATP ase " veröffentlichte Möller (1975). Wie der Radioimmunoassay ermöglicht der Enzymhemmungstest Herzglykosidspiegel im Nanogramm - Bereich nachzuweisen.

6.4.4 Radioimmunoassay

Der Radioimmunoassay dürfte derzeit die wichtigste klinische Routinemethode sein, um den Serumglykosidspiegel von Patienten während der Einstellung auf Herzglykoside zu bestimmen. Das Prinzip besteht darin, daß radioaktiv markierte und nicht radioaktiv markierte Digitaliskörper um spezifische Antikörper konkurrieren. Die

schließlich an den Antikörper gebundene Aktivität hängt vom Mengenverhältnis zwischen markierten und nicht markierten Glykosidmolekülen ab. Die Methode erlaubt mit Hilfe einer Eichkurve die zugegebene unbekannte Glykosidmenge zu bestimmen. Es können noch Mengen im Nanogramm-bereich erfaßt werden.

Zusammenfassungen von Forschungsergebnissen mit Literaturangaben finden sich bei Smith (1973) und Lesne (1976). Lesne beschreibt auch die Präparation und Isolierung von Antikörpern. Oliver et al. (1968) arbeiteten einen Test für Digitoxin aus. Antikörper gegen Digitoxin werden an Kaninchenerythrozyten gebunden und diese durch einen zweiten, gegen Digitoxin gerichteten Antikörper zur Präzipitation gebracht, falls die an die Erythrozyten gebundenen Antikörper mit Digitoxin besetzt waren. Zeegers et al. (1973) und Kramer et al. (1975) beschreiben vereinfachte Verfahren für Digoxin. Van der Vijgh (1975) beschäftigte sich damit, die Zuverlässigkeit eines Tests für Digoxin zu erhöhen. Walsh et al. (1977) konnten wie Kramer ein besonders einfaches Verfahren entwickeln. Reisert et al. (1977) beschreiben Kreuzreaktionen und Störungen des Verfahrens. Auch Goldman (1974) beschäftigt sich mit Störungsquellen. Eine vergleichende Gegenüberstellung von sechs Verfahren zur Bestimmung von Digoxin und Digitoxin im Blut veröffentlichten Bodem et al. (1973). Auch Borner et al. (1978) Mac Kinney et al. (1975) bewerten in ihren Arbeiten verschiedene Verfahren des Radioimmunoassay und des Enzymhemmungstests. Belpaire et al. (1975) prüfen die Brauchbarkeit verschiedener Radioimmunoassayverfahren bei Nierenerkrankungen.

7. Eigene Untersuchungen

Ziel der Untersuchungen war es, eine einfache Extraktionsmethode zu finden, mit deren Hilfe auch noch kleine Mengen der Herzglykoside in einen der Dünnschichtchromatographie noch zugänglichen Konzentrationsbereich gebracht werden können.

Gesucht wurde weiterhin nach einem dünnschichtchromatographischen Trennverfahren, welches die Glykoside von den im Extrakt noch vorhandenen Verunreinigungen trennen sollte.

Für die Identifizierung der Herzglykoside im Chromatogramm mußten noch geeignete Referenzlösungen und Sprühreagenzien gefunden werden.

Es soll nun zuerst das Vorgehen bei der Extraktion und das dünnschichtchromatographische Bestimmungsverfahren beschrieben werden, anschließend werden die Ergebnisse bei Anwendung des Verfahrens auf herzoglykosidhaltiges Untersuchungsmaterial wiedergegeben.

7.1 Extraktion der Herzglykoside

7.1.1 Herstellung von Untersuchungsmaterial

Um immer gleichmäßiges Untersuchungsmaterial zur Verfügung zu haben und um die Brauchbarkeit des Nachweisverfahrens auch an einem extrem verunreinigten Stoffgemisch zu erproben, wurde anstelle eines Mageninhalts eine selbst zusammengestellte Mischung verwendet, die eine große Menge an Pigmenten und anderen störenden Stoffen enthalten haben dürfte.

Diese Mischung wurde durch Zugabe von konz. HCl auf einen pH - Wert von 1,5 gebracht. Die Zusammensetzung des Untersuchungsmaterials enthält Tab. 3.

Tab. 3: Zusammensetzung des Untersuchungsmaterials

Material	Menge
Eigelb	480g
passierte Rinderleber	140g
Flüssigkeit aus einer Magensonde	170g
Stärke, Kartoffelpüreeflocken, Semmelbrösel, alles in Wasser aufgekocht	460g
Tierblut	160g

Bei den Extraktionsversuchen wurden von dieser Mischung Portionen von 20g verwendet, die kurz vor der Aufarbeitung mit unterschiedlichen Kombinationen von Glykosiden in relativ großen Mengen versetzt worden waren, da an eine orale Aufnahme der Herzglykoside in Überdosis gedacht war. Die Herzglykoside wurden dem Untersuchungsmaterial in Form pharmazeutischer Präparate zugesetzt. Menge und Präparat sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Dem Untersuchungsmaterial zugefügte Herzglykoside; Menge, pharmazeutisches Präparat und Zubereitungsform

Herzglykosid	Menge	Präparat	Form	Anzahl
Digitoxin	0,8mg	Digimerck ^R	Tabletten	8
Digoxin	0,8mg	Lanitor ^R	Tropfen	1,04ml
ß - Acetyl - Digoxin	0,8mg	Novodigal ^R	Tabletten	4
ß - Methyl - Digoxin	0,8mg	Lanitor ^R	Tabletten	16
Lanatosid C	1,2mg	Celadigal ^R	Tropfen	1,2ml
Convallariaglykoside	1,2mg	Convacard ^R	Tropfen	1,0ml
Proscillaridin	1,0mg	Talusin ^R	Dragees	2

Rechnerisch ergeben sich daraus folgende Glykosidmengen in mg / 100g des Untersuchungsmaterials:

Digitoxin	4,0mg / 100g
Digoxin	4,0mg / 100g
ß - Acetyl - Digoxin	4,0mg / 100g
ß - Methyl - Digoxin	4,0mg / 100g
Lanatosid C	6,0mg / 100g
Convallariaglykoside	6,0mg / 100g
Proscillaridin	5,0mg / 100g

Das mit den Herzglykosidpräparaten versetzte Untersuchungsmaterial wurde mit dem Bühler - Homogenisator bei mittlerer Stärke 1min lang homogenisiert. Anschließend wurde die entstandene dickflüssige Masse bei 3500U zentrifugiert. Es entstand ein wässriger, gelb - grüner, leicht getrübler Überstand. Dieser wurde immer sofort weiter aufgearbeitet.

7.1.2 Extraktion des Untersuchungsmaterials

Durch Erhitzen wasserfrei gemachtes Natriumsulfat kann Wasser erneut binden, wobei 1 Mol des wasserfreien Salzes 10 Mol Wasser bindet. Es wurde versucht, den glykosidhaltigen, wässrigen Überstand des zentrifugierten Untersuchungsmaterials mit Hilfe von wasserfreiem Natriumsulfat zu trocknen. Auf 20g Na_2SO_4 wurden hierzu 2ml des Überstandes unter Verreiben gegeben. Es entstand eine pulverige, trocken aussehende Masse, die in ein großes Zentrifugenglas gegeben und mit 50ml Chloroform 5min geschüttelt wurde. Nach kurzem Zentrifugieren wurde das nun schwach gelblich gefärbte Chloroform abgegossen. Im Zentrifugat fand sich auch kein Hinweis auf noch vorhandenes Wasser. Der Bodensatz wurde aufgerührt und ein zweites Mal mit 50ml Chloroform ausgeschüttelt und abzentrifugiert. Anschließend wurden die beiden Chloroformauszüge vereinigt und auf einem Wasserbad von 70°C weitgehend eingeeengt. Es entstand ein kräftig rotbraun gefärbter Rückstand in einer Menge von 0,5ml.

Geräte und Chemikalien für die Extraktion

Geräte:

Reibschälchen

Pipette 2ml

Meßzylinder 100ml
Becherglas 100ml
großes Zentrifugenglas
Zentrifuge
Abdampfschälchen
Wasserbad von 70°C

Chemikalien

wasserfreies Natriumsulfat
Chloroform

7.2 Qualitatives Dünnschichtchromatographisches
Nachweisverfahren

Ein dünnschichtchromatographisches Nachweisverfahren zerfällt in zwei Teile:

- a) Auftrennung der Analysenlösung durch das Trennsystem stationäre Phase / mobile Phase,
- b) Identifizierung der Stoffe auf der Platte durch Anfärben mit Sprühreagenzien und Vergleich mit Referenzsubstanzen.

7.2.1 Dünnschichtchromatographische Trennung

Trennsystem:

Für die Auftrennung der Lösungen und Extrakte erwiesen sich als Sorptionsmittel Kieselgel 60 F₂₅₄ - Fertigplatten der Firma Merck, 20 / 20cm, Schichtdicke 0,25mm als geeignet. Sie wiesen gegenüber selbst hergestellten Platten eine weitaus bessere Trennschärfe auf.

Das gewählte Fließmittel war Essigester - Pyridin -
- Wasser = 5 : 1 : 4 (Steinegger et al., 1961) in ei-
ner Menge von 300ml. Wie Vorversuche ergaben, war es für
die Auftrennung der geprüften Herzglykoside am besten
geeignet. Als Chromatographiekammer diente die Desaga -
- Standard - Kammer.

Vorbereitung:

Alle Arbeitsgeräte wurden vor Gebrauch mit heißer Spül-
mittellösung gereinigt, dann mit heißem Leitungswasser
und mit destilliertem Wasser gespült. Eine Stunde vor
der Trennung wurde die Kammer mit 300ml Laufmittel
von Raumtemperatur, ca. 22°C, gefüllt und zur Hälfte
mit Filterpapier ausgekleidet. So konnte sich die Kammer-
atmosphäre sättigen. Der Deckel war mit einem Dichtungs-
mittel bestrichen worden. Die zur Auftrennung bestimmten
Lösungen wurden auf Platten aufgetragen, die ca. 1h im
Trockenschrank bei 110°C aktiviert worden waren.

Auftragung:

Die Auftragung erfolgte auf einer Linie im Abstand von
3cm vom unteren Rand der Platte. Zu den Seitenrändern
wurden Abstände von mindestens 1,5cm gewahrt. Zwischen
den einzelnen Auftragungspunkten wurde ein Mindestab-
stand von 1cm eingehalten. Die Auftragungspunkte hatten bei
allen Trennungen Durchmesser von ca. 0,5cm. Sie wurden
mit einem Volumen von 5µl oder einem Vielfachen davon
beladen. Zur Auftragung wurde eine 5µl Goldbrandpipette
aus Kunststoff benutzt. Manche Proben wurden auch als
Strich (1,5 x 0,2cm) aufgebracht. Die Auftragungs-
dimensionen konnten oft nur eingehalten werden, wenn mit
dem Föhn während des Beladens der Startpunkte gleich-
zeitig getrocknet wurde. Dies war vor allem bei den

wässrigen Lösungen nötig.

Trennung:

Nach dem Auftragen wurden die Referenz - und Analysenlösungen mit dem Föhn bei höchster Temperaturstufe vortrocknet, und anschließend im Trockenschrank bei 110°C für 5min nachgetrocknet. Nachdem sich die Dünnschichtplatten auf Raumtemperatur abgekühlt hatten, wurden sie in die Chromatographiekammer gestellt, deren Boden ca. 2cm hoch mit Fließmittel bedeckt war. Die Laufstrecke wurde auf 10cm festgelegt, die Laufzeit betrug 30 - 35min.

Nachbehandlung:

Die entwickelten Platten mußten zunächst mit Heißluft aus dem Föhn und dann 5min bei 110°C im Trockenschrank getrocknet werden. Dies war erforderlich, da das Wasser des Laufmittels die Farbreaktion zwischen Sprühreagenzien und Herzglykosiden stört. Nach dem Abkühlen wurden sie mit Sprühreagenz besprüht.

Geräte und Chemikalien für die dünnschichtchromatographische Trennung:

Geräte:

Desaga - Standard - Kammer

Filterpapier zum Auskleiden der Kammer

Dichtungsmittel

Föhn

Trockenschrank

5µl - Pipette aus Kunststoff

Chemikalien:

Spülmittel

Essigester
Pyridin
aqua destillata

7.2.1.1 Untersuchung der Trenneigenschaften des
Laufmittels

In Vorversuchen waren verschiedene Laufmittel auf ihre Trenneigenschaften für ein Gemisch der sieben Herzglykoside, mit denen sich diese Arbeit befaßt, untersucht worden. Untersucht wurde eine Lösung von je 1mg

Digitoxin
Digoxin
ß - Acetyl - Digoxin
ß - Methyl - Digoxin
Lanatosid C
Convallariaglykoside
Proscillaridin

in 2ml 90% igem Äthanol.

Außerdem wurde von jedem Herzglykosid eine Referenzlösung hergestellt, durch Lösen von 2mg des Glykosids in 2ml 90% igem Äthanol. Die Herzglykoside standen als kristalline Reinglykoside zur Verfügung.⁺ In den Vorversuchen wurden 5µl der Lösung des Glykosidgemischs und je

⁺ Die Reinglykoside wurden freundlicherweise von den Firmen Merck / Darmstadt (Digitoxin), Boehringer / Mannheim (Digoxin, ß - Acetyl - Digoxin, ß - Methyl - Digoxin), Beiersdorf (Lanatosid C), Madaus (Convallariaglykoside) und Knoll (Proscillaridin) zur Verfügung gestellt.

5µl der Lösungen der Reinglykoside der Trennung durch die verschiedenen Laufmittel unterworfen. Die Auftragung auf die Kieselgel - Fertigplatten (Merck) erfolgte punktförmig (weiteres Vorgehen wie unter 7.2.1). Nach der Entwicklung der Platten wurden die Glykoside mit dem Antimontrichlorid - Reagenz sichtbar gemacht. Das beste Trennergebnis lieferte das Laufmittel Essigester - Pyridin - Wasser = 5 : 1 : 4.

Ergebnisse:

Es waren schmal - elliptische Flecken der Glykoside entstanden, die im Tageslicht und im UV - Licht von 366nm sichtbar waren. Die Farben im Tageslicht und die Fluoreszenzen im UV - Licht von 366nm, wie sie Antimontrichlorid - Reagenz und die beiden anderen, ebenfalls geprüften Reagenzien (p - Anisaldehyd - Reagenz, 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz) den Herzglykosiden verliehen, sind unter 7.2.2.1 genauer beschrieben. An dieser Stelle sind, als Charakteristikum des Laufmittels, die R_f - Werte der Herzglykoside in Tab. 5 zusammengestellt. Aus den R_f - Werten geht hervor, daß die

Kombination Digitoxin
 Digoxin
 Lanatosid C

und die

Kombination β - Acetyl - Digoxin
 β - Methyl - Digoxin
 Convallariaglykoside
 Proscillaridin

ohne weiteres vom Laufmittel getrennt werden. So konnten, bei den durchgeführten Extraktionen der Herzglyko-

Tab. 5: R_f Werte von sieben Herzglykosiden bei dünn-
schichtchromatographischer Trennung mit dem
Laufmittel Essigester - Pyridin - Wasser =
= 5 : 1 : 4 auf Kieselgel - Fertigplatten

Herzglykosid	R_f - Wert
ß - Methyl - Digoxin	61
ß - Acetyl - Digoxin	55
Digitoxin	55
Proscillaridin	50
Digoxin	49
Convallariaglykosid ⁺	29
Convallariaglykosid ⁺	26
Lanatosid C	21
Convallariaglykosid ⁺	17

side aus dem Untersuchungsmaterial (s. 7.3) die einzel-
nen Portionen des Untersuchungsmaterials (= " Magenin-
halt ", Herstellung s. 7.1.1) mit Herzglykosiden in die-
sen beiden Kombinationen versetzt werden, da das Lauf-

⁺ Das, von der Firma Madaus zur Verfügung gestellte
Glykosidpräparat aus der Convallariapflanze, ergab bei
der Chromatographie drei, durch unterschiedlichen R_f -
- Wert ausgezeichnete Fraktionen.

mittel die verschiedenen Herzglykoside im gewonnenen Extrakt voneinander trennt. Das Laufmittel hat als weiteren Vorteil, die nur kurze Entwicklungszeit von 30min. Es trennte ausserdem die Herzglykoside ohne Schwanz - oder Bart - Bildung und erfaßte auch die durch Säurehydrolyse aus den Herzglykosiden entstandenen Bruchstücke (Nachweis und R_f - Werte s. unter 7.2.2.2).

7.2.2 Identifizierung der Herzglykoside auf dem Chromatogramm

Die Identifizierung der Herzglykoside auf dem Chromatogramm erfolgte durch Sprühreagenzien und Referenzsubstanzen.

7.2.2.1 Sprühreagenzien

Drei Sprühreagenzien erwiesen sich als geeignet, die Herzglykoside auch bei geringer Auftragungsmenge noch sichtbar zu machen. Es waren dies Antimontrichlorid - , p - Anisaldehyd - und 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz.

Zusammensetzung und Anwendungsvorgang:

a) Antimontrichlorid - (Carr - Price) - Reagenz:

Nach der Vorschrift von Neher (1964) wurde eine 20% ige Lösung von $SbCl_3$ in Chloroform hergestellt. $SbCl_3$ war leichter löslich, wenn das Lösungsmittel vorsichtig erwärmt wurde. Da $SbCl_3$ mit Wasser zu unwirksamen $SbOCl$, Antimonoxychlorid, reagiert, das als weißer Niederschlag ausfällt, wurde mit sorgfältig getrockneten Geräten gearbeitet. Deswegen mußten die Platten nach dem Entwickeln 5min bei $110^{\circ}C$ getrocknet werden, um das

Wasser des Laufmittels zu vertreiben. Nach dem Besprühen wurde das Chromatogramm 5min auf 120°C erhitzt.

b) p - Anisaldehyd - Reagenz:

Zwei verschieden zusammengesetzte Reagenzien wurden geprüft, die jedoch bei der Anwendung gleiche Resultate lieferten. Nach Sjöholm (1962) werden kurz vor Gebrauch des Reagenz 0,5ml p - Anisaldehyd, 5ml 70% ige Perchlorsäure, 10ml Azeton und 40ml Wasser gemischt. Nach Stahl et al. (1967) löst man 0,5ml p - Anisaldehyd in 50ml Eisessig. Dieser Mischung wird vor dem Besprühen 1ml konz. H_2SO_4 zugesetzt. Nach dem Entwickeln wurden die Dünnschichtplatten vorgetrocknet und sehr sparsam dreimal mit dem Reagenz besprüht, wobei nach jedem Besprühen die Platte für ca. 1,5min im Trockenschrank bei 110°C aufbewahrt wurde. Von dieser Behandlung wurde eine optimale Farbentwicklung und eine weitgehende Schonung der Herzglykoside erhofft.

c) 3,5 - Dinitrobenzoesäure - (Keddes) - Reagenz:

Zur Anwendung kam das Reagenz in der Zusammensetzung nach Kisser (1969). Eine 2% ige Lösung von 3,5 - Dinitrobenzoesäure in Methanol und eine 2 n Lösung von KOH in Methanol werden kurz vor dem Besprühen zu gleichen Teilen gemischt. Nach dem Besprühen erschienen die Farben ohne weiteres Zutun. Dieses Reagenz erzeugte keine Fluoreszenz im UV - Licht. Die Farben verschwanden nach einer halben Stunde, konnten jedoch durch erneutes Besprühen regeneriert werden.

Farb - und Fluoreszenzreaktionen:

Eine Zusammenstellung der Farben und Fluoreszenzen, die die Sprühreagenzien bei den Herzglykosiden hervorriefen, enthält Tab. 6.

Tab. 6: Farb - und Fluoreszenzreaktionen von sieben Herzglykosiden mit Antimontrichlorid - Reagenz, p - Anisaldehyd - Reagenz und 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz

Herzglykosid	SbCl ₃ ⁺ Tages- licht	SbCl ₃ ⁺ UV-Licht 366nm	p-Anisal- ⁺⁺ dehyd Tageslicht	3,5-Dini- ⁺⁺⁺ trobenzoesäure Tageslicht
B - Methyl - Digoxin	grau blau	hell blau	schwarz grau	rot violett
B - Acetyl - Digoxin	grau blau	hell blau	schwarz grau	rot violett
Digitoxin	grau blau	rost braun	schwarz grau	rot violett
Proscillaridin	grau blau	rosa	schwarz grau	rot violett
Digoxin	grau blau	hell blau	schwarz grau	rot violett
Convallariaglykoside	gelb grün	gelb weiß	schwarz grau	rot violett
Lanatosid C	grau blau	hell blau	schwarz grau	rot violett

⁺Die erhaltenen Farben und Fluoreszenzen blieben etwa eine Woche stabil.

⁺⁺Die Farben waren etwa drei Stunden stabil. Eine Fluoreszenz im UV - Licht konnte nicht festgestellt werden.

⁺⁺⁺Die Farben waren etwa eine halbe Stunde stabil und durch Nachsprühen regenerierbar. Im UV - Licht ergab dieses Reagenz mit den Herzglykosiden keine Fluoreszenz.

Nachweisgrenzen der Sprühreagenzien

Die Nachweisgrenzen der drei Sprühreagenzien wurden ermittelt, indem Verdünnungsreihen der Reinglykoside (die Glykoside wurden in jeweils 2ml 90% igem Äthanol gelöst) chromatographiert wurden. Die Chromatographie erfolgte wie unter 7.2.1 beschrieben. Die Lösungen wurden in Volumina von jeweils 5µl auf einem Fleck von 0,5cm Durchmesser aufgetragen. Die sich ergebenden Nachweisgrenzen sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Tab. 7: Nachweisgrenzen von sieben Herzglykosiden bei Anwendung von Antimontrichlorid - Reagenz, p - Anisaldehyd - Reagenz und 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz (in µg / Auftragfläche)

Herzglykosid	SbCl ₃ Tageslicht	SbCl ₃ UV-Licht 366nm	p-Anisaldehyd Tageslicht	3,5-Dinitrobenzoesäure Tageslicht
ß - Methyl - Digoxin	0,5	0,1	0,2	1,0
ß - Acetyl - Digoxin	0,5	0,1	0,2	1,0
Digitoxin	0,5	0,1	0,5	1,0
Proscillaridin	1,5	0,5	1,0	1,0
Digoxin	0,5	0,1	0,2	1,0
Convallariaglykoside	1,5	0,5	1,0	1,0
Lanatosid C	1,25	0,3	0,5	1,0

Brauchbarkeit der Sprühreagenzien für den Nachweis von Herzglykosiden in verunreinigten Extrakten

Bei der Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials (s. unter 7.3) gelangten stark verunreinigte herzoglykosidhaltige Extrakte zur Chromatographie, so daß im Chromatogramm auf deren Laufstrecken eine Menge von störenden Substanzen zu erwarten war. So hing die Brauchbarkeit der Sprühreagenzien nicht zuletzt davon ab, in welchem Ausmaß sie andere Substanzen der zu trennenden Lösungen, außer den Herzglykosiden, anfärbten und ob sie fähig wären, den Herzglykosiden so charakteristische Farben bzw. Fluoreszenzen zu verleihen, daß sie auch in einem Feld von Störsubstanzen noch erkannt werden konnten. Um dies zu prüfen wurden gleichartige Chromatogramme von Chloroformextrakten aus glykosidhaltigem Untersuchungsmaterial (Extraktion s. unter 7.1.2) zusammen mit geeigneten Referenzlösungen hergestellt, mit den drei Reagenzien besprüht und die entstandenen Farben und Fluoreszenzen miteinander verglichen. Es ergaben sich folgende Beobachtungen:

Ergebnisse:

Bei Betrachtung im Tageslicht fand sich auf der Laufstrecke der Chloroformextrakte immer ein teils rotbraun, teils graubraun gefärbtes, von der Startlinie bis zur Laufmittelfront reichendes Feld von Verunreinigungen. Im R_f - Bereich der Glykoside waren die Farben der Verunreinigungen relativ schwach ausgeprägt. Trotzdem aber waren die Glykoside, wenn das Chromatogramm mit Antimontrichlorid - Reagenz oder mit p - Anisaldehyd - Reagenz besprüht worden war, nicht zu sehen, wahrscheinlich weil diese Reagenzien die Herzglykoside

nur schwach grau anfärben, ein Farbton, der sich gegen die Farben der Verunreinigungen nicht durchsetzen konnte. Auch die von Antimontrichlorid - Reagenz gelbgrün gefärbten Convallariaglykoside konnten sich nicht abheben. Antimontrichlorid - Reagenz bzw. p - Anisaldehyd - Reagenz waren also, trotz ihrer hohen Empfindlichkeit, wegen Art und Menge der, in unserem Untersuchungsmaterial enthaltenen Verunreinigungen, nicht geeignet, die Herzglykoside im Tageslicht nachzuweisen. Dagegen konnten die Herzglykoside mit Hilfe von 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz im Tageslicht sichtbar gemacht werden, da eine auffällig rotviolette Farbe entstand. Trotz einer geringeren Empfindlichkeit scheint sich dieses Reagenz also zu eignen, Herzglykoside auch in stark verunreinigten Extrakten im Tageslicht sichtbar zu machen. Im UV - Licht von 366nm konnten die Herzglykoside mit Antimontrichlorid - Reagenz relativ leicht nachgewiesen werden, da auffällige Fluoreszenzen entstanden, die sich von der Fluoreszenz der Verunreinigungen deutlich abhoben. Das p - Anisaldehyd - Reagenz erzeugte bei 366nm keine Fluoreszenz. Es schien also sinnvoll zu sein, für den Nachweis von Herzglykosiden in stark verunreinigten Lösungen das Antimontrichlorid - Reagenz bevorzugt anzuwenden.

7.2.2.2 Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen für die Identifizierung unveränderter Herzglykoside:

Da Reinglykoside teuer sind und auch im akuten Vergiftungsfall nicht schnell beschafft werden können, mußte geprüft werden, ob auch im Handel befindliche

Tropfenpräparate der einzelnen Glykoside bzw. einfache wässrige Lösungen von Dragees oder Tabletten, als Referenzsubstanzen in Frage kommen können. Es wurden deshalb jeweils 5µl äthanolische Lösung des Reinglykosids neben 5µl seiner pharmazeutischen Zubereitung chromatographiert. Die verwendeten Präparate sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Tab. 8: Pharmazeutische Präparate als Referenzsubstanzen für Herzglykoside; Präparat und Konzentration in der Referenzlösung

Herzglykosid	Präparat	Form	Konzentration
β - Methyl - Digoxin	Lanitop ^R	Tropfen	0,6mg / ml
β - Acetyl - Digoxin	Novodigal ^R	Tropfen	0,4mg / ml
Digitoxin	Digimerck ^R	Tropfen	0,1mg / ml
Proscillaridin	Talusin ^R	Draggees	0,5mg / ml
Digoxin	Lanicor ^R	2 Drag. zus. 1mg in 2ml H ₂ O Tropfen	0,75mg / ml
Convallariaglykoside	Convacard ^R	Tropfen	1,2mg / ml
Lanatosid C	Celadigal ^R	Tropfen	1,0mg / ml

Ergebnisse:

Nach Besprühen der Chromatogramme mit den drei Reagenzien konnte man feststellen, daß Reinglykosidlösungen und pharmazeutische Präparate gleichwertige Referenzsubstanzen sind, da sie sich weder im R_f - Wert noch in der Färbung im Tageslicht bzw. der Fluoreszenz in UV - Licht unterscheiden. Für eine im Tageslicht noch sichtbare Färbung genügte es, bei Anwendung von Antimontrichlorid - Reagenz oder p - Anisaldehyd - Reagenz, von den Tropfenpräparaten bzw. von der wässrigen Lösung der Talusin^R - Dragees 5µl aufzutragen. Bei der Anwendung von 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz mußten von Digimerck^R, für eine im Tageslicht noch sichtbare Färbung 2 x 5µl aufgetragen werden. Von den übrigen Präparaten waren 5µl ebenfalls ausreichend. Im UV - Licht entstand mit Hilfe von Antimontrichlorid - Reagenz bei Auftragung von 5µl der Präparate eine lebhaft Fluoreszenz. Man kann also durchaus käufliche Herzglykosidpräparate in den angegebenen Auftragungsmengen als Referenzsubstanzen für die Identifizierung von Herzglykosiden gebrauchen.

Referenzsubstanzen für die Identifizierung von Spaltprodukten der Herzglykoside nach Säurehydrolyse:

Da die Herzglykoside im Mageninhalt durch dessen Säure schon nach einigen Stunden hydrolysiert sein können, wurde versucht, Referenzsubstanzen für den Nachweis der Spaltprodukte herzustellen. Durch folgendes Vorgehen entstanden Lösungen, die Glykosidhydrolysate enthielten: Tabletten oder Dragees wurden zerrieben und die geringen Mengen an Material in Reagenzgläser geeigneter Größe übergeführt. Dann wurden zu jedem Präpa-

rat 2ml 1 n HCl gegeben und der Ansatz kurz über der Gasflamme unter Schütteln aufgeköcht. Nach dem Abkühlen hatte sich die Tablettengrundsubstanz schon abgesetzt und es stand ein relativ klarer Überstand für die Auftragung zur Verfügung. Das Hydrolysat wurde immer frisch zubereitet und sofort verwendet. Die, nach diesem Verfahren behandelten Präparate und die benötigten Mengen dieser Präparate sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

Tab. 9: Herstellung von Referenzlösungen zum Nachweis von Spaltprodukten von Herzglykosiden nach Hydrolyse; Präparate und Glykosidmengen

Herzglykosid	Präparat	Form	Zahl	Menge
ß - Methyl - Digoxin	Lanitop ^R	Tabletten zu 0,1mg	4	0,4mg
ß - Acetyl - Digoxin	Novodigal ^R	Tabletten zu 0,2mg	2	0,4mg
Digitoxin	Digimerck ^R	Tabletten zu 0,1mg	4	0,4mg
Proscillaridin	Talusin ^R	Dragees zu 0,5mg	1	0,5mg
Digoxin	Lanicor ^R	Tabletten zu 0,25mg	2	0,5mg
Convallariaglykoside	Convacard ^R	Dragees zu 1,2mg	1	1,2mg
Lanatosid C	Celadigal ^R	Dragees zu 0,25mg	2	0,5mg

Ergebnisse:

Zum Besprühen der entwickelten Chromatogramme wurde Antimontrichlorid - Reagenz benutzt, welches wegen seiner Empfindlichkeit geeignet schien, die zu erwartenden sehr geringen Mengen an Spaltprodukten der Herzglykoside sichtbar zu machen. Es gelang in der Tat auch nur mit diesem Reagenz, Glykosidspaltprodukte in den Präparathydrolysaten und in den Chloroformextrakten aus glykosidhaltigem Untersuchungsmaterial (unter 7.3.3 beschrieben) nachzuweisen. Es fanden sich auf der Laufstrecke der durch Aufkochen der Präparate in HCl gewonnenen Lösungen mehrere fluoreszierende Flecken (auf der Laufstrecke des Proscillaridinhydrolysates jedoch nur ein Fleck, jedoch von anderem R_f - Wert als Proscillaridin selbst) gegenüber nur einem Fleck auf der Laufstrecke des unveränderten, entsprechenden Präparates. Da diese Flecken ungefähr gleiche, nur schwächere Fluoreszenz wie die Glykosidflecken auf der Laufstrecke der unbehandelten Präparate aufwiesen (Farben und Fluoreszenzen der Herzglykoside s. unter 7.2.2.1, Tab. 6), durfte man annehmen, daß diese Flecken von Spaltprodukten der Herzglykoside verursacht worden waren, die aus diesen wahrscheinlich durch Abspaltung von einem oder mehreren Zuckern hervorgegangen waren. In Tab. 10 sind die R_f - Werte der Herzglykoside den R_f -Werten ihrer Spaltprodukte gegenübergestellt. Das beschriebene Verfahren scheint also geeignet zu sein, Referenzsubstanzen für Spaltprodukte der Herzglykoside zu gewinnen.

Tab. 10: R_f - Werte von Herzglykosiden und ihrer, durch Säureeinwirkung entstandenen Spaltprodukte

Herzglykosid	R_f - Wert unveränderte Substanz	R_f - Werte der Spaltprodukte
β - Methyl - Digoxin Lanitolop ^R	61	65 70
β - Acetyl - Digoxin Novodigal ^R	55	58 70
Digitoxin Digimerck ^R	55	65 72
Proscillaridin Talusin ^R	50	86
Digoxin Lanicor ^R	49	56 63
Convallariaglykoside Convacard ^R	17 26 29	15 26 29
Lanatosid C Celadigal ^R	21	42 54 63

7.3 Anwendung des Verfahrens für den qualitativen Nachweis der Herzglykoside bzw. ihrer nach Hydrolyse entstandenen Spaltprodukte im Untersuchungsmaterial

7.3.1 Nachweis der Herzglykoside im nichtextrahierten Untersuchungsmaterial

Herzglykoside als Reinstoffe sind in Wasser unlöslich. Im Mageninhalt dürften sich jedoch Lipide und Proteine befinden, welche die Rolle von Lösungsvermittlern spielen können. Ausserdem sind in pharmazeutischen Zubereitungen, als welche die Herzglykoside in der Regel in den Magen gelangen, sicher Begleitstoffe enthalten, die die Wasserlöslichkeit der Herzglykoside fördern. Deshalb sollten die im Wasser des Mageninhalts gelösten Herzglykoside eigentlich auch ohne weitere Umstände, lediglich durch Chromatographie dieses wässrigen Anteils, nachzuweisen sein, falls sie in einer Menge vorliegen, die an die Nachweisgrenze der Sprühreagenzien heranreicht und falls sie nicht von Verunreinigungen überdeckt werden.

Um die Richtigkeit dieser Annahme zu prüfen, wurde zu 20g Untersuchungsmaterial (Herstellung s. 7.1.1, Tab. 3) die Kombination Celadigal^R, Lanicor^R, Digimerck^R gegeben, anderen 20g Untersuchungsmaterial wurde die Kombination Novodigal^R, Lanitop^R, Convacard^R und Talusin^R zugefügt. Die Herzglykoside wurden in einer Menge (s. 7.1.1, Tab. 4) wie schon beschrieben zugesetzt. Die beiden Portionen des Untersuchungsmaterials wurden homogenisiert und zentrifugiert. Es verblieben zwei Überstände, die sofort mit Referenzsubstanzen (entsprechende pharmazeutische Präparate, wie unter 7.2.2.2, Tab. 8 angegeben), einem Leerwert (Über-

stand von zentrifugiertem Untersuchungsmaterial ohne Glykosidzusatz) und mit Lösungen von Cholesterin und Cholsäure in Chloroform auf zwei Platten aufgetragen wurden. Cholesterin und Cholsäure wurden mit aufgetragen, da sie im Körper produziert (Gallensäuren, Membranlipide) und auch mit der Nahrung zugeführt werden. Sie können also im Mageninhalt vorkommen. Beide Stoffe enthalten, wie auch die Herzglykoside, das Grundgerüst der Steroide und reagieren deshalb mit den Sprühreagenzien. Um die Möglichkeit der Verwechslung oder der Überlagerung von Cholesterin und Cholsäure mit den Herzglykosiden wegen eines eventuell ähnlichen R_f - Wertes und ähnlicher Farben oder Fluoreszenzen auszuschließen bzw. nachzuweisen, wurden die Lösungen beider Stoffe auf den Chromatogrammen mitgeführt. Von den zur Chromatographie bestimmten Lösungen gelangten immer 5 μ l oder ein Vielfaches von 5 μ l (s. Abb. 1 und 2) auf Flecken von 0,5cm Durchmesser zur Auftragung. Die dünnschichtchromatografische Trennung wurde wie unter 7.2.1 beschrieben durchgeführt. Nach der Auftrennung wurden die Chromatogramme mit dem Antimontrichlorid - Reagenz besprüht und im UV - Licht von 366nm betrachtet, da es sich gezeigt hatte, daß von den drei geprüften Reagenzien, nur dieses Reagenz die deutlichste Darstellung kleiner Glykosidmengen zu liefern in der Lage war (s. 7.2.2.1). Es wurde deshalb bei allen Versuchen, die sich mit dem Nachweis von Herzglykosiden und ihrer Spaltprodukte im Untersuchungsmaterial befaßten, bevorzugt angewandt.

Die nachfolgenden Abb. 1 und 2 zeigen die Auftragung auf den beiden Chromatogrammen und das Ergebnis nach Entwickeln und Besprühen der Platten in schematisierter Darstellung.

Abb. 1: Nachweis von drei Herzglykosiden im nicht gereinigten und nicht extrahierten Untersuchungsmaterial (Versuch 7.3.1); schematische Darstellung des Chromatogramms

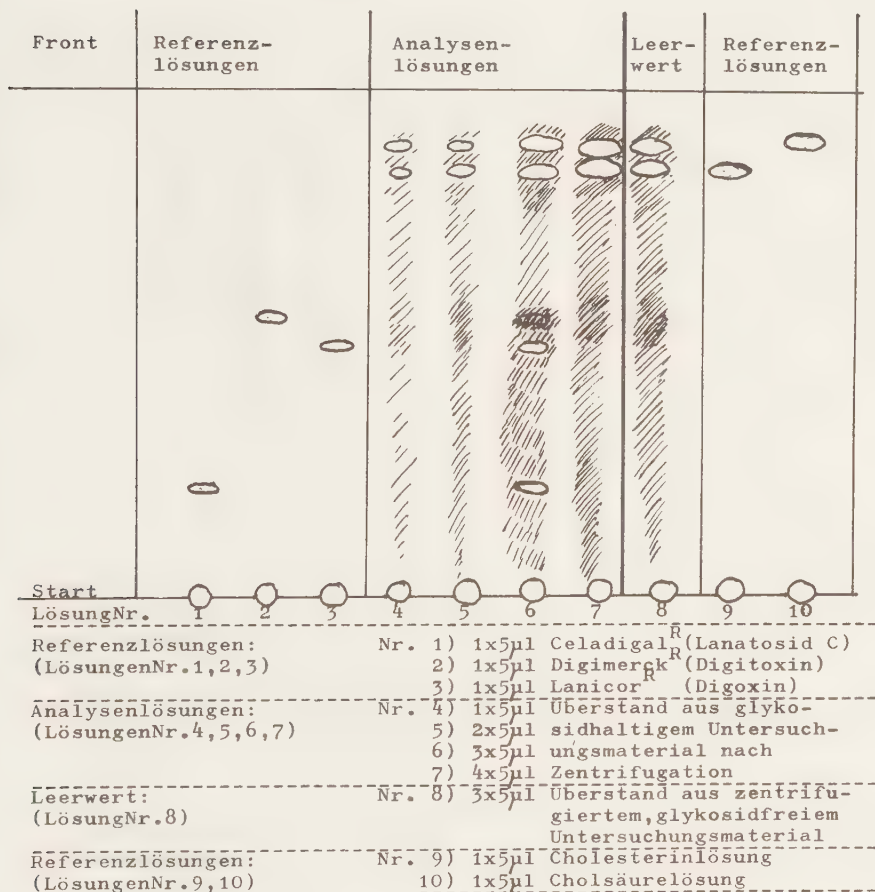


Abb. 2: Nachweis von vier Herzglykosiden im nicht gereinigten und nicht extrahierten Untersuchungsmaterial (Versuch 7.3.1); schematische Darstellung des Chromatogramms



Ergebnisse:

Ein kräftig rostbraun fluoreszierender, länglicher Fleck von Verunreinigungen fand sich auf der Laufstrecke aller Analysenlösungen von etwa 2cm unterhalb der Front an nach abwärts bis in den Bereich der Herzglykoside hinein. In diesem Fleck hoben sich, in Höhe von Cholesterin und Cholsäure, die als Referenzsubstanzen mit aufgetragen worden waren, zwei Flecken mit ähnlich rosa Fluoreszenz hervor. Bei diesen Flecken könnte es sich also um, im Untersuchungsmaterial vorhanden gewesene Verunreinigungen von Cholesterin und Cholsäure gehandelt haben. Da diese beiden Stoffe größere R_f - Werte und auch andere Fluoreszenzen besitzen als die sieben Herzglykoside, scheint eine Verwechslung von Cholesterin und Cholsäure mit diesen Herzglykosiden ausgeschlossen zu sein.

Außer Digitoxin konnten alle der sieben geprüften Herzglykoside auf den Laufstrecken der dreifach aufgetragenen Analysenlösungen durch Vergleich mit den Referenzlösungen und mit dem Leerwert nachgewiesen werden.

Auf der Laufstrecke der Analysenlösungen fanden sich nämlich Flecken gleicher Fluoreszenz und gleichen R_f - Wertes wie sie auch auf der Laufstrecke der Referenzlösungen zu beobachten waren. Auf der Laufstrecke des Leerwertes fehlten diese Flecken. In Höhe von Digitoxin jedoch, befand sich eine rostbraun fluoreszierende Verunreinigung, von der es sich nicht zweifelsfrei abhob. Auch der Vergleich mit dem Leerwert half nicht weiter. Die übrigen Glykoside befanden sich teils in einem relativ wenig verunreinigten Bereich (Lanatosid C, Digoxin, Proscillaridin, Convallariaglykoside), was ihren Nachweis erleichterte, teils traten sie auf Grund ihrer

hellblauen Fluoreszenz, obwohl in einem Feld von Verunreinigungen gelegen, deutlich hervor (β - Acetyl - Digoxin, β - Methyl - Digoxin).

Auf der Laufstrecke der nur ein - oder zweimal aufgetragenen Analysenlösungen konnten keine Glykoside festgestellt werden. Wahrscheinlich lag die Auftragsmenge unter der Nachweisgrenze des Antimontrichlorid - Reagenz. Bei vierfacher Auftragung entstand eine von der Startlinie bis zur Laufmittelfront reichende, rötlich - rosa fluoreszierende Schwanzbildung in welcher keine Glykoside mehr nachgewiesen werden konnten. Anscheinend wird bei vierfacher Auftragung die Startfläche überladen. Das Ergebnis zeigt also, daß Herzglykoside, recht einfach, auch in einer stark verunreinigten, wässrigen Lösung (Mageninhalt) nachzuweisen sind, durch bloße Chromatographie der wässrigen Phase des Untersuchungsmaterials, falls sie in ausreichender Konzentration darin vorhanden sind und nicht von Verunreinigungen überdeckt werden. Derart kleine Glykosidmengen konnten nur noch mit dem-Antimontrichlorid - Reagenz erfaßt werden. Die, in einem Auftragungsvolumen von $5\mu\text{l}$ maximal vorhanden gewesenen Glykosidmengen (in μg) ergeben sich, wenn man von einem Wassergehalt des Untersuchungsmaterials von ca. 80% (wie Eindampfen des Untersuchungsmaterials ergab) und den zugesetzten Glykosidmengen (s. 7.1.1, Tab.4) ausgeht und annimmt, das Glykosid habe sich nur in der wässrigen Phase verteilt. In Tab. 11 sind diese Glykosidmengen zusammengestellt.

Tab. 11: Maximaler Glykosidgehalt (in μg / $5\mu\text{l}$) des
Überstandes aus zentrifugiertem, glykosid-
haltigem Untersuchungsmaterial

Herzglykosid	Menge (in μg / $5\mu\text{l}$)
Digitoxin	0,25
Digoxin	0,25
β - Acetyl - Digoxin	0,23
β - Methyl - Digoxin	0,23
Lanatosid C	0,375
Convallariaglykoside	0,375
Proscillaridin	0,312

7.3.2 Nachweis der Herzglykoside im Chloroformextrakt
aus Untersuchungsmaterial

Zwei Portionen Untersuchungsmaterial von je 20g (Herstellung s. 7.1.1) wurden mit den Glykosidkombinationen Celadigal^R, Lanicor^R, Digimerck^R und Novodigal^R, Lanitop^R, Convacard^R, Talusin^R in Mengen nach 7.1.1, Tab. 4 versetzt. Die, nach Zentrifugation dieses Untersuchungsmaterials verbliebenen Überstände wurden nach dem unter 7.1.2 be-

schriebenen Extraktionsverfahren extrahiert. Zur Auftragung gelangten Referenzsubstanzen für die Herzglykoside (s. 7.2.2, Tab. 8), jeweils 5µl auf einem Fleck von 0,5cm Durchmesser, die Chloroformextrakte aus dem Untersuchungsmaterial (5µl auf einem Fleck von 0,5cm Durchmesser, 5µl auf einem Strich 1,5 x 0,2cm), ein Leerwert (Chloroformextrakt aus glykosidfreiem Untersuchungsmaterial, ebenfalls fleckförmige und punktförmige Auftragung) und 3 x 5µl der wässrigen Phase des glykosidhaltigen Untersuchungsmaterials vor deren Extraktion mit Chloroform. Dieser nach Zentrifugation des glykosidhaltigen Untersuchungsmaterials zunächst entstehende Überstand wurde deshalb mit Chromatographiert, um sicherer beurteilen zu können, ob die anschließende Extraktion mit Chloroform die Konzentration der Herzglykoside wesentlich erhöht hatte. Nach dem Entwickeln (s. 7.2.1) wurden die Chromatogramme mit dem Antimontrichlorid - Reagenz besprüht und im Tageslicht und im UV - Licht von 366nm betrachtet. Die nachfolgenden Abb. 3 und 4, S. 71 und 72, zeigen die Auftragung auf den beiden Chromatogrammen und das Ergebnis nach Entwickeln und Besprühen der Platten in schematisierter Darstellung.

Ergebnisse:

Auf der Laufstrecke der Chloroformextrakte konnten im Tageslicht keine Glykoside beobachtet werden. Ebenso nicht, wie schon beim vorigen Versuch, auf der Laufstrecke des Überstandes aus zentrifugiertem, glykosidhaltigem Untersuchungsmaterial. Dagegen erstreckte sich auf der Laufstrecke des Chloroformextraktes nun vom Start bis zur Front ein einheitlich, kräftig rotbraun gefärbter Strich von Verunreinigungen. Im UV - Licht von 366nm

Abb. 3: Nachweis von drei Herzglykosiden im Chloroformextrakt des Untersuchungsmaterials (Versuch 7.3.2); schematische Darstellung des Chromatogramms

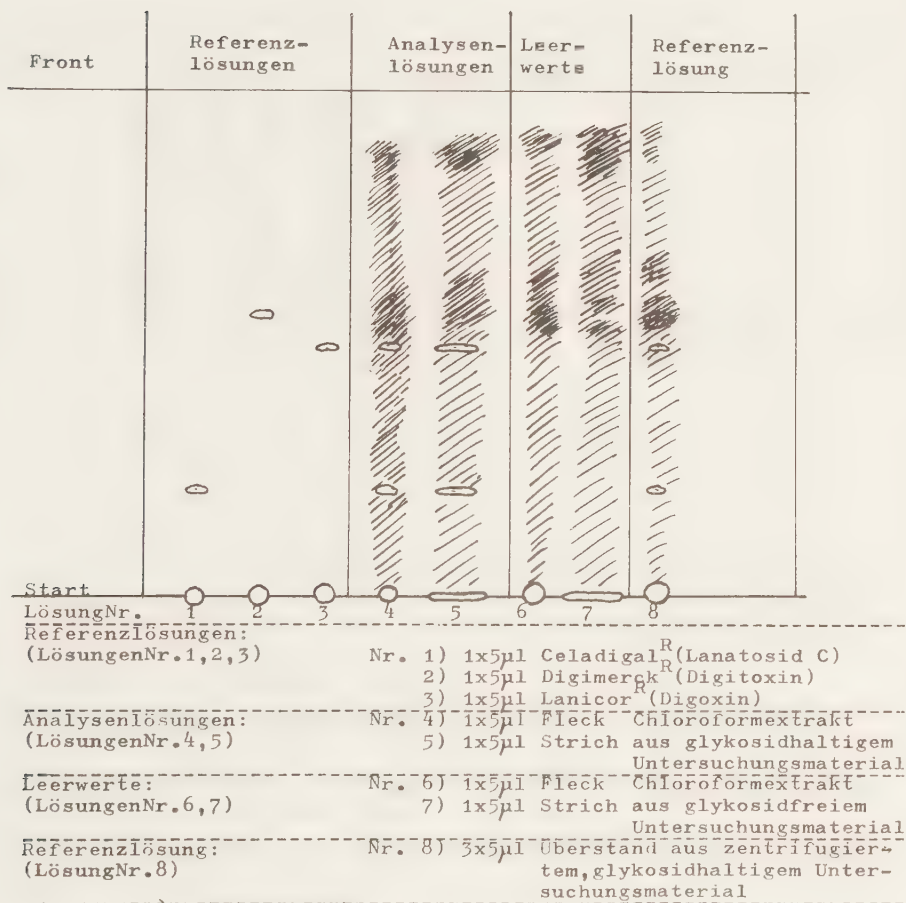
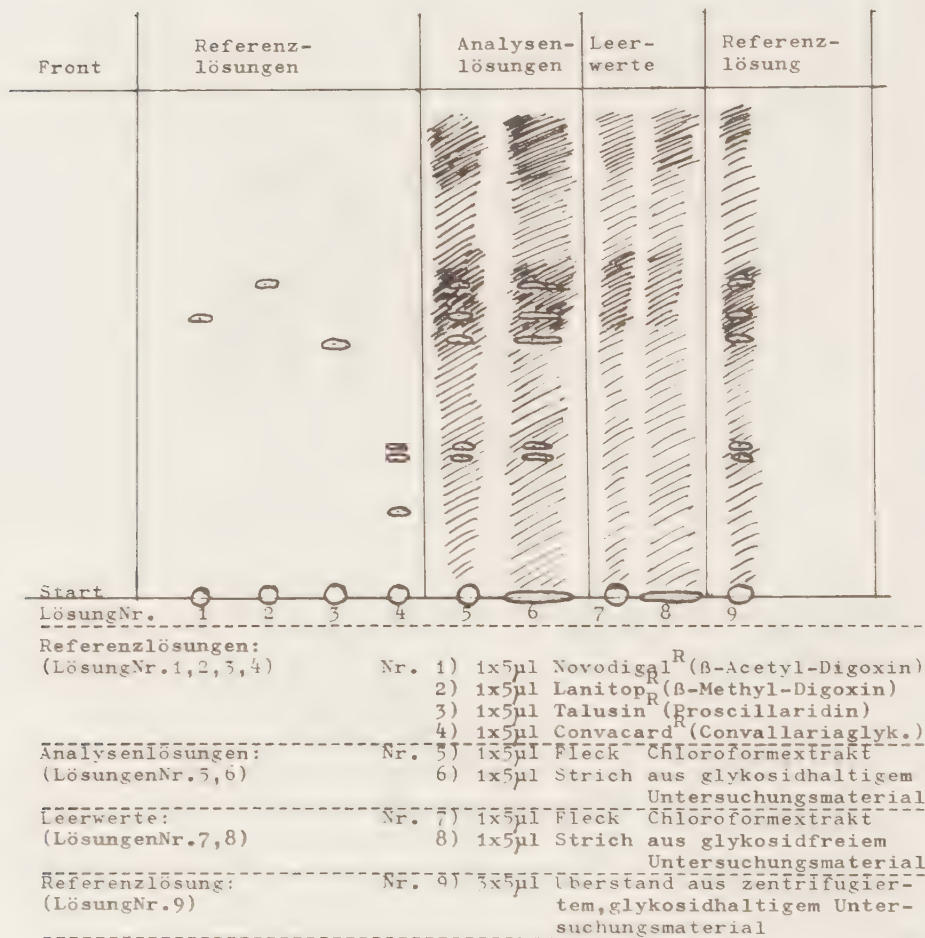


Abb. 4: Nachweis von vier Herzglykosiden im Chloroformextrakt des Untersuchungsmaterials (Versuch 7.3.2); schematische Darstellung des Chromatogramms



erschien dieser Strich als rosa fluoreszierender Schleier, der im Bereich von 2cm unterhalb der Laufmittelfront bis zur Laufmittelfront besonders kräftig, bräunlich rosa fluoreszierte. Auf der Laufstrecke der Chloroformextrakte waren zwei (Abb. 3) bzw. vier (Abb. 4) fluoreszierende Flecken zu beobachten, von gleicher Fluoreszenz und gleichem R_f - Wert wie die Flecken auf der Laufstrecke der, als Referenzlösungen mitchromatographierten Herzglykosidpräparate. Die Flecken auf der Laufstrecke der Chloroformextrakte dürften deshalb von Herzglykosiden verursacht gewesen sein. Überdies war zu beobachten, daß die Fluoreszenz der Glykoside auf der Laufstrecke der Chloroformextrakte wesentlich stärker war, als die der Glykoside auf der Laufstrecke des nach Zentrifugieren des glykosidhaltigen Untersuchungsmaterials verbliebenen Überstandes. Dies zeigt, daß die Glykosidkonzentration durch das Extraktionsverfahren erhöht werden konnte. Digitoxin konnte weder im Chloroformextrakt noch im wässrigen Überstand nachgewiesen werden, da sich im R_f - Bereich dieses rostbraun fluoreszierenden Glykosids der ausgeprägt bräunlich rosa fluoreszierende Fleck von Verunreinigungen befand, der das rostbraun fluoreszierende Digitoxin überdeckte. Digitoxin konnte auch nicht mit Hilfe des Leerwertes bestimmt werden. Die übrigen Glykoside zeigten sich, trotz der nun in höherer Konzentration vorhandenen Verunreinigungen durch die schon beschriebenen, lebhaften Fluoreszenzen. Digoxin, β - Acetyl - Digoxin, β - Methyl - Digoxin, Lanatosid C waren leuchtend hellblau, Proscillaridin war leuchtend rosa und die Convallariaglykoside waren gelbgrün. Bei strichförmiger Auftragung war die Darstellung der Glykoside etwas deutlicher, da die Verunreinigungen besser abgetrennt wurden.

7.3.3 Nachweis von Glykosidspaltprodukten im Chloroformextrakt des Untersuchungsmaterials

Man muß damit rechnen, daß im Mageninhalt unter der Einwirkung der darin enthaltenen Säure allmählich eine Hydrolyse der Herzglykoside stattfindet. Es wurde untersucht, ob es möglich wäre, so entstandene Spaltprodukte der Herzglykoside nachzuweisen.

Zu diesem Zweck wurden je 20g Untersuchungsmaterial (Herstellung s. 7.1.1) mit den Präparatkombinationen Celadigal^R, Digimerck^R, Lanicor^R bzw. Novodigal^R, Lanitop^R, Talusin^R, Convacard^R (Mengen s. 7.1.1, Tab. 4) versetzt. Die Ansätze wurden erst nach einem Tag durch Extraktion mit Chloroform, wie unter 7.1.2 beschrieben, aufgearbeitet. Auserdem wurde wieder ein Leerwert durch Extraktion glykosidfreien Untersuchungsmaterials mit Chloroform hergestellt und mit Chromatographiert. Als Referenzlösungen dienten Herzglykosidpräparate (Mengen s. 7.2.2, Tab. 8) und die, nach dem unter 7.2.2.2 (Tab. 9) beschriebenen Verfahren hergestellten Hydrolysate der Herzglykoside. Von diesen Lösungen wurden je 5µl auf einem Fleck von 0,5cm Durchmesser aufgetragen. Um noch mehr Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurden die beiden Präparatkombinationen in einer Menge, wie sie auch dem Untersuchungsmaterial zugesetzt worden waren, in je 3ml in HCl hydrolysiert und von diesen Hydrolysaten je 5µl auf einem Fleck von 0,5cm Durchmesser ebenfalls mitaufgetragen. Nach dem Entwickeln der Chromatogramme kam Antimontrichlorid - Reagenz zur Anwendung. Die besprühten Chromatogramme wurden im UV - Licht von 366nm betrachtet. Die nachfolgenden Abb. 5 und 6 zeigen die Auftragung auf den beiden Chromatogrammen und das Ergebnis nach Entwickeln und Besprühen der Platten in schematisierter Darstellung.

Abb. 5: Nachweis von Spaltprodukten aus drei Herzglykosiden nach deren Hydrolyse durch säurehaltiges Untersuchungsmaterial (Versuch 7.3.3); schematische Darstellung des Chromatogramms

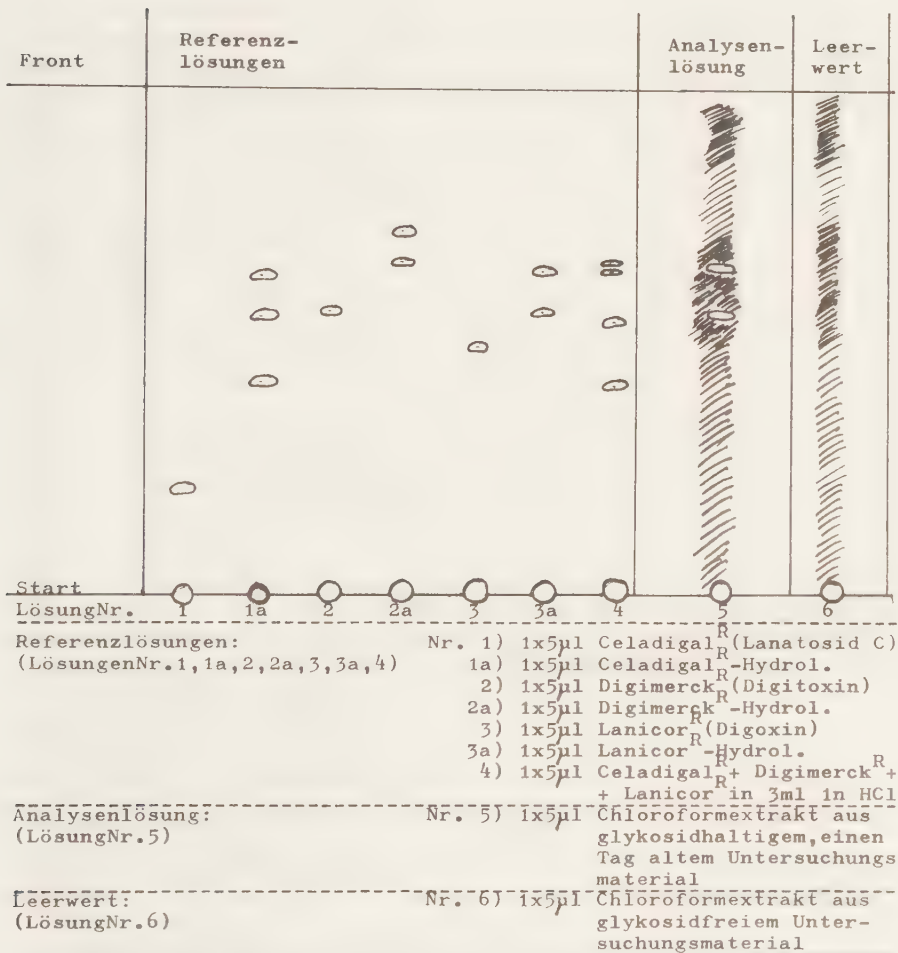
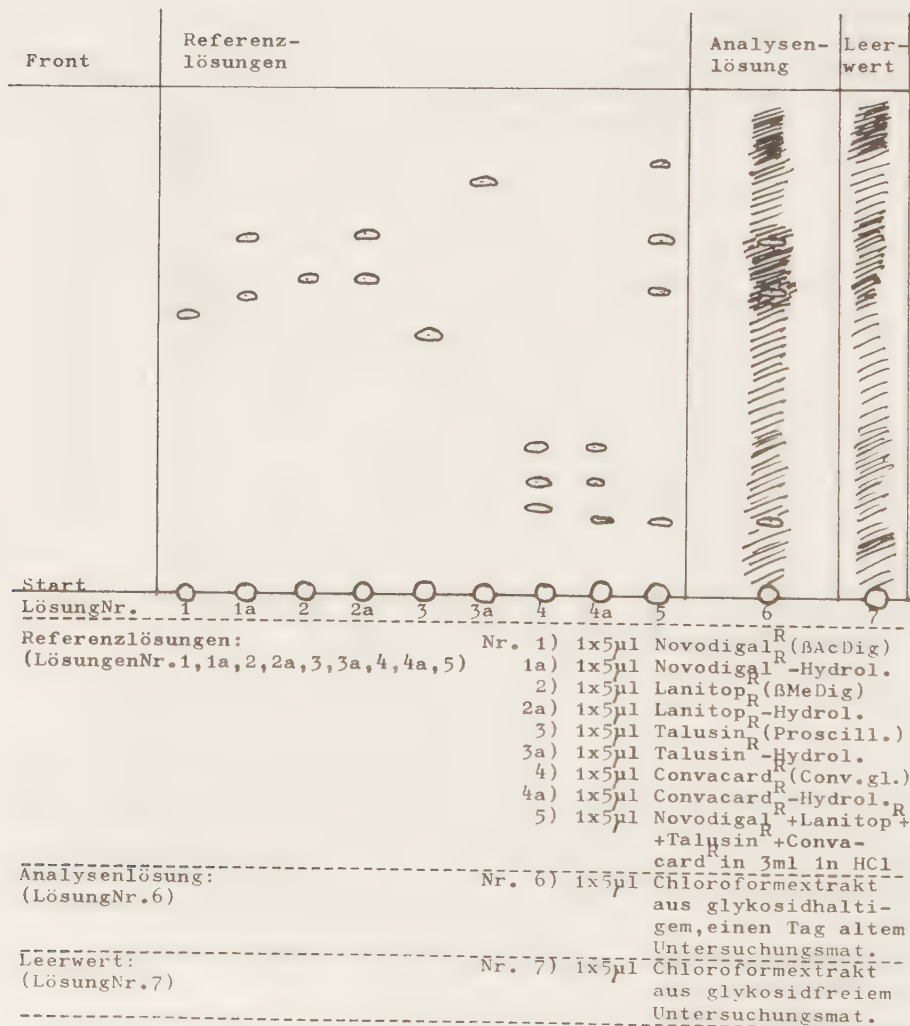


Abb. 6: Nachweis von Spaltprodukten aus vier Herzglykosiden nach deren Hydrolyse durch säurehaltiges Untersuchungsmaterial (Versuch 7.3.3); schematische Darstellung des Chromatogramms



Ergebnisse:

Das Chromatogramm der Abb. 5 zeigte folgende Befunde:

Auf der Laufstrecke des Hydrolysates des Gemisches aus Celadigal^R (Lanatosid C), Digimerck^R (Digitoxin) und Lanicor^R (Digoxin) waren drei weißblau fluoreszierende Flecken mit R_f - Werten wie die der ebenso fluoreszierenden Flecken auf der Laufstrecke der Hydrolysate der Einzelpräparate zu sehen. Auf dem obersten der drei weißblauen Flecken war eine sehr schmale, rostbraune Kappe zu sehen. Durch Vergleich mit den Referenzlösungen (Herzglykosidpräparate und ihre Hydrolysate) konnten die durch Spaltprodukte verursachten Flecken (auf der Laufstrecke des Hydrolysates der drei Herzglykoside) den entsprechenden Herzglykosiden zugeordnet werden. In Tab. 12 sind die Spaltprodukte den Herzglykosiden zugeordnet, auserdem ist ihr R_f -Wert und ihre Fluoreszenz in UV - Licht von 366nm angegeben.

Tab. 12: Spaltprodukte nach Hydrolyse eines Gemisches von Celadigal^R (Lanatosid C), Digimerck^R (Digitoxin) und Lanicor^R (Digoxin);
 R_f - Werte und Fluoreszenz in UV - Licht von 366nm

Spaltprodukt	R_f - Wert	Fluoreszenz
Spaltprodukt aus Lanatosid C	41	weißblau
Spaltprodukt aus Lanatosid C oder Digoxin	54	weißblau
Spaltprodukt aus Lanatosid C oder Digoxin	64	weißblau
Spaltprodukt aus Digitoxin	65	rostbraun

Fast den gleichen Anblick wie die Laufstrecke des Hydrolysates des Gemisches der drei Herzglykosidpräparate bot die Laufstrecke des Chloroformextraktes des Untersuchungsmaterials welches einen Tag zuvor mit eben diesen drei Herzglykosidpräparaten versetzt worden war. Trotz des wiederum kräftig rosa fluoreszierenden Schleiers von Verunreinigungen hoben sich weißblau fluoreszierende Flecken mit den R_f - Werten 64 und 54 hervor. Diese R_f - Werte wiesen auch die Spaltprodukte von Lanatosid C und Digoxin auf. Somit dürften sich im Untersuchungsmaterial Spaltprodukte aus diesen beiden Glykosiden befunden haben. Unverändertes Lanatosid C oder Digoxin konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Auch Digitoxin bzw. seine Spaltprodukte waren wegen der kräftigen Verunreinigungen nicht nachweisbar. Ein Fleck vom R_f - Wert 41 (wahrscheinlich aus Lanatosid C) wie er auf der Laufstrecke des Hydrolysates des Präparatgemisches auftrat, konnte auf der Laufstrecke des Chloroformextraktes nicht mehr beobachtet werden.

Das Chromatogramm der Abb. 6 zeigte folgende Befunde:

Auch hier fanden sich auf der Laufstrecke des Hydrolysates aus dem Gemisch Novodigal^R (β - Acetyl - Digoxin), Lanitop^R (β - Methyl - Digoxin), Talusin^R (Proscillaridin) und Convacard^R (Convallariaglykoside) fluoreszierende Flecken, die durch Vergleich mit den Referenzlösungen als Spaltprodukte von Herzglykosiden identifiziert werden konnten. Die R_f - Werte der Spaltprodukte, ihre Fluoreszenzen im UV - Licht von 366nm und ihre Zuordnung zu den Herzglykosiden finden sich in Tab. 13.

Tab. 13: Spaltprodukte nach Hydrolyse eines Gemisches von Novodigal^R (β - Acetyl - Digoxin), Lanitop^R (β - Methyl - Digoxin), Talusin^R (Proscillaridin) und Convacard^R (Convallariaglykoside); R_f - Werte und Fluoreszenz in UV - Licht von 366nm

Spaltprodukt	R_f - Wert	Fluoreszenz
Spaltprodukt aus Convallariaglykosiden	15	gelb
Spaltprodukt aus β -Acetyl- oder β -Methyl-Digoxin	60	hellblau
Spaltprodukt aus β -Acetyl- oder β -Methyl-Digoxin	70	hellblau
Spaltprodukt aus Proscillaridin	85	rosa

Im Chloroformextrakt aus dem Untersuchungsmaterial, welches einen Tag vorher mit dieser Glykosidkombination versetzt worden war, fanden sich alle Spaltprodukte außer dem aus Proscillaridin (welches die gleiche Fluoreszenz wie die Verunreinigungen aufwies und deshalb von ihnen überdeckt wurde), wie sie auch auf der Laufstrecke des Hydrolysates des Gemischs der vier Herzglykosidpräparate zu sehen waren. Die Spaltprodukte aus β - Acetyl - Digoxin und / oder β - Methyl - Digoxin traten auf Grund ihrer leuchtend blauen Fluoreszenz hervor, obwohl in einem Feld von Verunreinigungen gelegen. Das nur schwach gelblich fluoreszierende Spaltprodukt der Convallariaglykoside befand sich in einem relativ wenig verunreinigten Bereich. Unveränderte Glykoside konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

7.3.4 Versuch einer Vorreinigung des glykosidhaltigen Untersuchungsmaterials

Es wurde untersucht, ob es möglich wäre, durch Vorextraktion mit Äther die Konzentration der Störstoffe zu verringern.

Ein Überstand aus zentrifugiertem Untersuchungsmaterial, welches mit den Herzglykosiden Celadigal^R (Lanatosid C), Digimerck^R (Digitoxin) und Lanicor^R (Digoxin) versetzt worden war (Mengen an Untersuchungsmaterial und Glykosid wie unter 7.1.1) wurde halbiert. Der eine Teil wurde sofort mit Chloroform extrahiert (nach dem Verfahren unter 7.1.2) der andere Teil wurde zunächst durch dreimaliges Ausschütteln mit je 10ml Äther vorgereinigt. Anschließend wurde der vorgereinigte Überstand nach 7.1.2 mit Chloroform extrahiert. Diese beiden Extrakte, wie auch der Ätherextrakt, wurden auf gleiche Volumina durch Verdampfen eingeengt. Sie wurden zusammen mit Referenzsubstanzen und einem Leerwert chromatographiert.

Ergebnis:

Bei Vergleich der Laufstrecken des nicht vorgereinigten Chloroformextraktes und des vorgereinigten stellte sich nach Besprühen mit Antimontrichlorid - Reagenz und bei Betrachtung in UV - Licht von 366nm heraus, daß die Menge der Verunreinigungen im vorgereinigten Extrakt nicht wesentlich kleiner geworden war. Dagegen fand sich auf der Laufstrecke des Ätherauszugs ein fluoreszieren-der Fleck von Digoxin, während die Fluoreszenz des Digoxinflecks auf der Laufstrecke des vorgereinigten Extraktes abgenommen hatte. Digitoxin war auf der Laufstrecke beider Chloroformextrakte von Verunreinigungen überdeckt; die von Lanatosid C auf den Laufstrecken beider Extrakte verursachten Flecken wiesen keine auffälligen Unterschiede auf.

8. Endgültige Arbeitsvorschrift

a) Extraktion:

Geräte: Reibschälchen
 Meßzylinder, 100ml
 Becherglas, 100ml
 großes Zentrifugenglas
 Zentrifuge
 Abdampfschälchen oder Rotationsverdampfer
 Wasserbad von 70°C

Chemikalien: wasserfreies Natriumsulfat
 Chloroform

Das Untersuchungsmaterial (Mageninhalt) kann ohne weitere Vorbehandlung mit wasserfreiem Natriumsulfat verrieben werden, um das darin enthaltene Wasser zu binden. Die insgesamt benötigte Menge an Natriumsulfat hängt vom Wassergehalt und der Menge des Untersuchungsmaterials ab. Es hat sich erwiesen, daß zur Bindung von 2ml Wasser 20g Natriumsulfat ganz sicher ausreichen (s. 7.1.2). Die entstandene Masse wird mit Chloroform ausgeschüttelt, die Suspension durch Zentrifugation getrennt und der, als Überstand verbleibende Chloroformauszug in einem Wasserbad von 70°C auf ca. 0,5ml eingengt. Bei den Versuchen wurden 20g des, mit 2ml Untersuchungsmaterial verriebenen Natriumsulfats (s. 7.1.2) zweimal mit je 50ml Chloroform ausgeschüttelt. Diese, als Anhaltspunkt angegebenen Mengen, müssen bei Aufarbeitung einer größeren Portion Untersuchungsmaterial entsprechend vervielfacht werden.

b) Referenzlösungen für die Identifizierung der Herzglykoside:

Referenzlösungen für nicht hydrolysierte Herzglykoside:

Wie auch unter 7.2.2.2 ausgeführt, können pharmazeutische Präparate ohne weiteres als Referenzlösungen für unveränderte Herzglykoside dienen. Von den, in Tab. 14 zusammengefaßten Präparaten werden auf die Dünnschichtplatte jeweils 5µl auf einem Fleck von 0,5cm Durchmesser aufgebracht. Wenn bei der Detektion das Antimontrichlorid - Reagenz und das p - Anisaldehyd - Reagenz angewandt werden, so genügt diese Auftragsmenge, um einen noch im Tageslicht sichtbaren Fleck zu erzeugen. Bei Anwendung des 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz sollte sicherheitshalber die doppelte Menge aufgetragen werden.

Tab. 14: Pharmazeutische Präparate als Referenzsubstanzen für Herzglykoside; Präparat und Konzentration in der Referenzlösung

Herzglykosid	Präparat	Form	Konzentration
B - Methyl - Digoxin	Lanitop ^R	Tropfen	0,6mg / ml
B - Acetyl - Digoxin	Novodigal ^R	Tropfen	0,4mg / ml
Digitoxin	Digimerck ^R	Tropfen	0,1mg / ml
Proscillaridin	Talusin ^R	2 Drag. zus. 1mg in 2ml H ₂ O	0,5mg / ml
Digoxin	Lanicor ^R	Tropfen	0,75mg / ml
Convallariaglykoside	Convacard ^R	Tropfen	1,2mg / ml
Lanatosid C	Celadigal ^R	Tropfen	1,0mg / ml

Referenzlösungen für Spaltprodukte der Herzglykoside
nach Hydrolyse durch sauren Mageninhalt

Da im sauren Mageninhalt die Herzglykoside auch hydrolysiert vorliegen können, ist es angebracht, auf dem Chromatogramm auch Hydrolysate der Herzglykoside als Referenzlösungen mit aufzutragen. Die Hydrolysate werden hergestellt, indem die in Tab. 15 aufgeführten Präparatmengen in 2ml 1n HCl kurz aufgekocht werden. Nach dem Abkühlen ist die Lösung sofort zu verbrauchen (s. auch 7.2.2.2). Zur Auftragung gelangen immer 5 μ l der Lösungen auf einem Fleck von 0,5cm Durchmesser. Da die Spaltprodukte nur in geringer Menge vorliegen, werden sie nur sichtbar nach Besprühen mit dem Antimontrichlorid - Reagenz und bei Betrachtung des Chromatogramms im UV - Licht von 366nm.

Tab. 15: Herstellung von Referenzlösungen zum Nachweis von Spaltprodukten von Herzglykosiden nach Hydrolyse; Präparate und Glykosidmengen

Herzglykosid	Präparat	Form	Zahl	Menge
β - Methyl - Digoxin	Lanitop ^R	Tabletten	4	0,4mg
β - Acetyl - Digoxin	Novodigal ^R	zu 0,1mg Tabletten	2	0,4mg
Digitoxin	Digimerck ^R	zu 0,2mg Tabletten	4	0,4mg
Proscillaridin	Talusin ^R	zu 0,1mg Dragees	1	0,5mg
Digoxin	Lanicor ^R	zu 0,5mg Tabletten	2	0,5mg
Convallariaglykoside	Convacard ^R	zu 0,25mg Dragees	1	1,2mg
Lanatosid C	Celadigal ^R	zu 1,2mg Dragees zu 0,25mg	2	0,5mg

c) Dünnschichtchromatographische Trennung:

Geräte: Kieselgel 60 F₂₅₄ - Fertigplatten
 der Firma Merck / Darmstadt
 Desaga - Standard - Kammer
 Vaseline als Dichtungsmittel
 Filterpapier zum Auskleiden der Kammer
 Pipette (5 μ l)

Chemikalien: Essigester
 Pyridin
 aqua destillata

Die Auftrennung erfolgt auf Kieselgel 60 F₂₅₄ - Fertigplatten der Firma Merck, 20 x 20cm, Schichtdicke 0,25mm. Die Dünnschichtplatten werden vor Auftragung der zur Auftrennung bestimmten Lösungen 1h bei 110°C aktiviert. Die Auftragung der Referenzlösungen und des Chloroform-extraktes aus dem Untersuchungsmaterial erfolgt in einem Volumen von immer 1 x 5 μ l auf einem Fleck von 0,5cm Durchmesser. Der Chloroformextrakt sollte auch strichförmig (1,5 x 0,2cm) aufgetragen werden. Man kann auch die wässrige Phase des nichtextrahierten, ungereinigten Untersuchungsmaterials mit auf die Dünnschichtplatte auftragen. Es empfiehlt sich dann, mehrere Flecken mit bis zu 4 x 5 μ l zu beladen. Vor der Trennung werden die aufgebrachten Lösungen mit Heißluft aus dem Föhn getrocknet. Die Entwicklung erfolgt in der Desaga - Standard -
- Kammer bei Raumtemperatur von ca. 22°C; Steighöhe 10cm; Laufzeit ca. 35min. Als Laufmittel dient Essigester -
- Pyridin - Wasser = 5 : 1 : 4 in einer Menge von 300ml.

Die entwickelten Platten werden mit Heißluft vorgetrocknet und anschließend im Trockenschrank bei 110°C für 5min nachgetrocknet (zur dünnsschichtchromatografischen Trennung s. auch 7.2.1). Die Sprühreagenzien können nun zur Anwendung kommen.

Die Herzglykoside bzw. die, aus ihnen durch Hydrolyse entstandenen Spaltprodukte wiesen die, in Tab. 16 zusammengefaßten R_f - Werte auf:

Tab. 16: R_f - Werte von Herzglykosiden und ihrer, durch Säureeinwirkung entstandenen Spaltprodukte

Herzglykosid	R_f - Wert unveränderte Substanz	R_f - Werte der Spaltprodukte
B - Methyl - Digoxin Lanitop ^R	61	61 70
B - Acetyl - Digoxin Novodigal ^R	55	58 70
Digitoxin Digimerck ^R	55	65 72
Proscillaridin Talusin ^R	50	86
Digoxin Lanicor ^R	49	56 63
Convallariaglykoside Convacard ^R	17 26 29	15 26 29
Lanatosid C Celadigal ^R	21	42 54 63

c) Detektion:

Chemikalien: Antimontrichlorid
Chloroform
p - Anisaldehyd
Perchlorsäure, 70% l.
Azeton
Schwefelsäure, konz.
3,5 - Dinitrobenzoesäure
Methanol
Kalilauge, pelletiert

Bei der Detektion gelangten als Sprühreagenzien Antimontrichlorid - Reagenz, p - Anisaldehyd - Reagenz und 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz zur Anwendung.

Zusammensetzung, Anwendung, Farbreaktionen, Fluoreszenzreaktionen und Nachweisgrenzen der Sprühreagenzien (s. 7.2.2.1):

Antimontrichlorid - Reagenz

Zusammensetzung:

Es kommt nach Neher (1964) als 20% ige Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform zur Anwendung. Das Lösungsmittel sollte vorsichtig erwärmt werden.

Anwendung:

Nur gründlich vorgetrocknete Platten werden besprüht, da sich sonst unwirksames SbOCl , Antimonoxychlorid,

mit dem Wasser bildet. Deshalb müssen die Chromatogramme nach der Entwicklung 5min bei 110°C erhitzt werden. Die Chromatogramme werden im Tageslicht und im UV - Licht von 366nm ausgewertet.

p - Anisaldehyd - Reagenz

Zusammensetzung:

Nach Sjöholm (1962) werden kurz vor Gebrauch 0,5ml p - Anisaldehyd, 5ml 70% ige Perchlorsäure, 10ml Azeton und 40ml Wasser gemischt. In der Anwendung gleichwertig ist die Mischung nach Stahl et al. (1967). Sie besteht aus 0,5ml p - Anisaldehyd in 50ml Eisessig. Unmittelbar vor dem Besprühen wird dieser Mischung 1ml konz. H_2SO_4 zugesetzt.

Anwendung:

Die Platten werden vorsichtig und sparsam mehrmals besprüht und nach jedem Besprühen einige Minuten bei 110°C erhitzt. Auswertung im Tageslicht.

3,5 - Dinitrobenzoesäure - (Keddes) - Reagenz

Zusammensetzung:

Es wird, nach Kisser (1969), eine 2% ige Lösung von 3,5 - Dinitrobenzoesäure in Methanol und eine 2n Lösung von KOH in Methanol verwendet, die kurz vor dem Besprühen der Chromatogramme zu gleichen Teilen gemischt werden.

Anwendung:

Nach dem Besprühen erscheinen die Flecken ohne weiteres Zutun und können, wenn sie verblassen, einige Male durch erneutes Besprühen regeneriert werden.

Eine Aufstellung der, von den drei Spaltreagenzien verursachten Farb- und Fluoreszenzreaktionen findet sich in nachfolgender Tab. 17. Dazu muß gesagt werden, daß die Spaltprodukte der Herzglykoside nach Hydrolyse, die gleiche Fluoreszenz (sie waren nur mit Hilfe von Antimontrichlorid - Reagenz im UV - Licht darzustellen) wie die entsprechenden Herzglykoside aufwiesen. Somit gelten die Fluoreszenzen der Tab. 17 auch für die Spaltprodukte der Herzglykoside.

Tab. 17: Farb- und Fluoreszenzreaktionen von sieben Herzglykosiden mit Antimontrichlorid - Reagenz, p - Anisaldehyd - Reagenz und 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz

Herzglykosid	SbCl ₃ Tageslicht	SbCl ₃ UV-Licht 366nm	p-Anisaldehyd Tageslicht	3,5-Dinitrobenzoesäure Tageslicht
B - Methyl - Digoxin	grau blau	hell blau	schwarz grau	rot violett
B - Acetyl - Digoxin	grau blau	hell blau	schwarz grau	rot violett
Digitoxin	grau blau	rost braun	schwarz grau	rot violett
Proscillaridin	grau blau	rosa	schwarz grau	rot violett
Digoxin	grau blau	hell blau	schwarz grau	rot violett
Convallariaglykoside	gelb grün	gelb weiß	schwarz grau	rot violett
Lanatosid C	grau blau	hell blau	schwarz grau	rot violett

Die Nachweisgrenzen, wie sie sich bei Anwendung der drei Sprühreagenzien für die Detektion der sieben Herzglykoside ergaben, sind in Tab. 18 zusammengefaßt. Das Antimontrichlorid - Reagenz war nicht nur das empfindlichste der drei Reagenzien, sondern es verlieh den Herzglykosiden bzw. ihren Spaltprodukten auch eine auffällige Fluoreszenz, so daß es am geeignetsten scheint für den Nachweis der Herzglykoside in stark verunreinigten Lösungen.

Tab. 18: Nachweisgrenzen von sieben Herzglykosiden bei Anwendung von Antimontrichlorid - Reagenz, p - Anisaldehyd - Reagenz und 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz (in µg / Auftragfläche)

Herzglykosid	SbCl ₃ Tages- licht	SbCl ₃ UV-Licht 366nm	p-Anisal- dehyd Tageslicht	3,5-Dinitro- benzoesäure Tageslicht
β -Methyl - Digoxin	0,5	0,1	0,2	1,0
β - Acetyl - Digoxin	0,5	0,1	0,2	1,0
Digitoxin	0,5	0,1	0,5	1,0
Proscillaridin	1,5	0,5	1,0	1,0
Digoxin	0,5	0,1	0,2	1,0
Convallariaglykoside	1,5	0,5	1,0	1,0
Lanatosid C	1,25	0,3	0,5	1,0

9. Anwendung des Verfahrens für den Nachweis von β -
- Methyl - Digoxin in Mageninhalt aus einem Fall von
Suizid

Es bot sich die Gelegenheit das Verfahren bei einem Fall von Suizid mit Lanitop^R - Tabletten zu erproben. Weil zum Zeitpunkt des Ereignisses noch keine Referenzsubstanzen zum Nachweis von Spaltprodukten der Herzglykoside nach Hydrolyse zur Verfügung standen, wurde nur die Möglichkeit des Nachweises von unverändertem β - Methyl - Digoxin untersucht.

Das Untersuchungsmaterial war Mageninhalt einer 40 - jährigen Frau die tot in einem Stuhle sitzend aufgefunden worden war. Auf dem Tisch neben ihr lag eine leere Packung für 100 Tabletten Lanitop^R zu 0,1mg β - Methyl - Digoxin. Die aufgenommene Menge dürfte somit bei max. 10mg des Herzglykosids gelegen haben. Das Untersuchungsmaterial wurde nach der Extraktionsvorschrift von Punkt 8. aufgearbeitet. Der Mageninhalt war eine grünlich gefärbte, ziemlich wässrige Lösung mit geringfügigen, bröckeligen Verunreinigungen, die durch Zentrifugieren abgeschieden wurden. Insgesamt 20ml des Überstandes wurden in Portionen von 2ml mit je 20g Na_2SO_4 verrieben und jede Portion der entstehenden pulverigen Masse zweimal mit je 50ml Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden im Wasserbad von 70°C auf schließlich insgesamt 1,0ml eingeengt. Von diesem Extrakt wurden auf einer Kieselgel 60 F 254 - Fertigplatte (Merck) 5 μ l auf einem Punkt von 0,5cm Durchmesser und 5 μ l auf einem Strich (1,5 x 0,2cm) aufgetragen. Als Referenzlösungen dienten 5 μ l von Lanitop^R - Tropfen (0,6mg / ml) und

5µl einer Lösung von 6 Lanitop^R Tabletten zu 0,1mg in 2ml H₂O. Außerdem wurden vom wässrigen Überstand des Untersuchungsmaterials, der nach Zentrifugation verblieben war, 3 x 5µl auf einem Punkt von 0,5cm Durchmesser zum Vergleich mitaufgetragen. Nach Entwicklung des Chromatogramms mit 300ml Essigester - Pyridin - Wasser = 5 : 1 : 4 in der Desaga - Standard - Kammer, Laufhöhe 10cm wurde es 5min bei 110°C getrocknet und mit dem Antimontrichlorid - Reagenz besprüht. Bei Auswertung des Chromatogramms in UV - Licht von 366nm konnte auf den beiden Laufstrecken der Chloroformextrakte β - Methyl - Digoxin anhand gleicher hellblauer Fluoreszenz wie sie auch die Referenzsubstanzen aufwiesen und durch gleichen R_F - Wert von 61 nachgewiesen werden. Auf der Laufstrecke des wässrigen Überstandes konnte kein Glykosid nachgewiesen werden.

10. Diskussion

Bei der Ausarbeitung des Verfahrens wurden die Nachweismöglichkeiten der Herzglykoside Digitoxin, Digoxin, β - Acetyl - Digoxin, β - Methyl - Digoxin, Lanatosid C und Proscillaridin geprüft, da diese Glykoside zu den am häufigsten verordneten gehören. Außerdem wurden die Convallariaglykoside des Convacard^R in die Untersuchungen miteinbezogen, da die Glykoside des freiverkäuflichen Präparates nicht ungefährlich sind. So berichten Ludewig et al. (1974) von einem Kind, das zu Tode kam, nachdem es Wasser aus einer Blumenvase getrunken hatte, in der zuvor ein Maiglöckchenstrauß gewesen war.

Das Verfahren ist zwar für den Nachweis kleinster Glykosidmengen nicht mehr geeignet, dafür erfordert es aber nur geringen Arbeitsaufwand und kann durchaus größere Mengen der Herzglykoside in einem stark verunreinigten Substrat wie Mageninhalt noch erfassen. Dazu muß gesagt werden, daß das Verfahren an einer selbst zusammengestellten Mischung von Lebensmitteln, die auf einen pH - Wert von 1,5 gebracht worden war (s. 7.1.1) erprobt wurde, um seine Eignung auch an einem stark verunreinigten Stoffgemisch zu prüfen.

Das, bei der dünnschichtchromatographischen Trennung des Chloroformextraktes aus dem Untersuchungsmaterial benutzte Fließmittel Essigester - Pyridin - Wasser = 5 : 1 : 4 hat den Vorteil, die geprüften Herzglykoside und ihre Spaltprodukte in R_f - Bereiche zwischen 20 und 70 zu transportieren (s. 7.2.1.1 und 7.2.2.2). Es ist dies ein Bereich in welchem die Auftrennung am schärfsten sein soll mit nur geringer Schwanz - oder Bartbildung. Die erhaltenen Glykosidflecke waren auch immer schmal. Die ohnehin geringen Substanzmengen wurden nicht noch zusätzlich ausgebreitet. Das Fließmittel trennt zwar nicht ein Gemisch aller geprüfter Glykoside, doch ist dies in der Praxis auch nicht unbedingt notwendig, da im Untersuchungsmaterial wahrscheinlich nur ein Glykosid vorkommen wird. Wichtig ist dann nur, daß es überhaupt vom Fließmittel bewegt wird und zwar in einen möglichst günstigen R_f - Bereich. Als ein weiterer Vorteil kommt hinzu, daß die mitextrahierten Verunreinigungen zum größten Teil über den R_f - Bereich der Glykoside hinaus transportiert worden sind und deshalb nicht störten. Lediglich Digitoxin konnte nicht nachgewiesen werden, da das Fließmittel dieses Glykosid nicht deutlich von

den Verunreinigungen trennte. Doch dürfte die als Untersuchungsmaterial benutzte Mischung hinsichtlich ihres Störstoffgehaltes extrem gewesen sein und es ist wahrscheinlich, daß ein echter Mageninhalt geringere Mengen an störenden Stoffen enthalten wird. Die nur kurze Entwicklungszeit von nur 35min trägt zur Schnelligkeit des Verfahrens bei.

Während in der Literatur als Referenzlösungen entweder teure Reinglykoside verwendet, oder Glykoside aus Tropfen, Tabletten oder Dragees, durch oft längere Extraktionsverfahren isoliert werden, hat es sich gezeigt, daß Tropfenpräparate ohne weitere Umstände, bzw. Tabletten oder Dragees durch Lösen in Wasser als Referenzlösungen zu verwenden sind (s. 7.2.2.2). Diese Referenzsubstanzen sind leicht zu beschaffen, ermöglichen schnelles Arbeiten und sind wesentlich billiger als Reinglykoside. Es scheint auch gelungen zu sein, durch kurzes Aufkochen in Säure aus diesen Präparaten eine Referenzlösung für Spaltprodukte der Herzglykoside, wie sie im sauren Mageninhalt entstehen und vor allem im gealterten Untersuchungsmaterial vorhanden sein können (s. 7.2.2.2), zu gewinnen.

Bei den Sprühreagenzien haben sich Antimontrichlorid - Reagenz und p - Anisaldehyd - Reagenz bei Auswertung der Chromatogramme im Tageslicht als gleichermaßen ungünstig erwiesen. Denn es kann, je nach Art und Menge der Verunreinigungen, vorkommen, daß sich die nur unauffällig graublau gefärbten Glykoside gegen die Farbe der Störsubstanzen nicht durchsetzen können. Günstiger ist in diesem Fall 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz, welches durch seine Spezifität für den Lactonring weniger Begleitstoffe anfärbt. Es verleiht zudem den Herzglykosi-

den eine kräftig violettrote Farbe. Allerdings ist es nicht so empfindlich. Doch können die Glykoside im Chloroformextrakt in relativ hoher Konzentration vorliegen. Die kleinsten Glykosidmengen konnten am deutlichsten mit Antimontrichlorid - Reagenz im UV - Licht von 366nm nachgewiesen werden, wegen der entstehenden, auffälligen Fluoreszenzen. 3,5 - Dinitrobenzoesäure - Reagenz und p - Anisaldehyd - Reagenz ergaben im UV - Licht von 366nm mit den Herzglykosiden keine Fluoreszenzen (s. auch 7.2.2.1).

Der entscheidende Schritt des Extraktionsverfahrens, der andere, aufwendigere Methoden zur Konzentrationsanreicherung der Herzglykoside erspart ist die Bindung der wässrigen Phase des Untersuchungsmaterials mit wasserfreiem Natriumsulfat (s. 7.1.2). Dieses Verfahren im Zusammenhang mit Herzglykosiden ist nicht unbekannt, da es auch von der pharmazeutischen Industrie angewandt wird um glykosidhaltiges Pflanzenmaterial zu trocknen und zu konservieren. Durch Inaktivierung pflanzlicher Enzyme werden die Herzglykoside dabei vor Abbau geschützt. Die anschließende Elution der, beim Verreiben von Natriumsulfat mit dem Untersuchungsmaterial entstandenen, pulverigen Masse mit Chloroform erfaßt, wie die Dünnschichtchromatographie zeigte (s. 7.3.3), nicht nur unveränderte Herzglykoside sondern auch ihre, durch Säureeinwirkung entstandenen Spaltprodukte. So ist das ausgearbeitete Extraktionsverfahren zusammen mit dem dünn-schichtchromatographischen Nachweisverfahren geeignet, Herzglykoside indirekt an Hand ihrer Spaltprodukte auch in älterem Untersuchungsmaterial nachzuweisen.

Die, in nachfolgender Tab. 19 angegebenen Glykosidmen-

gen, die in 100g Untersuchungsmaterial noch aufgefunden werden konnten, konnten mit dem Antimontrichlorid -
- Reagenz und bei Betrachtung des Chromatogramms im UV -
- Licht von 366nm nachgewiesen werden.

Tab. 19: Im Untersuchungsmaterial nachgewiesene Mengen
der Herzglykoside (mg Herzglykosid / 100g Untersuchungsmaterial)

Herzglykosid	Menge
Digitoxin	4,0
Digoxin	4,0
ß - Acetyl - Digoxin	4,0
ß - Methyl - Digoxin	4,0
Lanatosid C	6,0
Convallariaglykoside	6,0
Proscillaridin	5,0

Aufgrund der relativ deutlichen Darstellung mit diesem Reagenz darf man annehmen, daß auch noch kleinere Mengen an Herzglykosiden einen Befund ergeben. Im älteren Untersuchungsmaterial kann der Nachweis der Glykoside indirekt,

anhand ihrer Bruchstücke gelingen. Die angegebenen Mengen dürften in solchen Fällen ungefähr die Nachweisgrenze darstellen, da das Glykosid dann in mehrere, durch Hydrolyse entstandene Fraktionen zerfällt.

Die Vorreinigung des Untersuchungsmaterials mit Atherscheint wenig nützlich zu sein, da die Menge der Störstoffe nicht wesentlich verringert, andererseits aber Glykosid aus dem Ansatz entfernt wurde. Da sich die Glykoside auch ohne Vorreinigung gut darstellen, kann darauf verzichtet werden.

Über den Nachweis von Herzglykosiden in Körperflüssigkeiten und Geweben, auch im Zusammenhang mit akzidentellen, suizidalen oder homizidalen Glykosidvergiftungen, liegen eine Reihe von Berichten vor. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, werden dort technisch aufwendigere Verfahren angewandt mit entsprechend besseren Nachweiserfolgen. Insgesamt gesehen hat sich die Dünnschichtchromatographie beim analytischen Problem " Herzglykosid in tierischen Geweben " recht gut bewährt.

Eine ausführliche Arbeit über die Extraktion eines Herzglykosids aus Mageninhalt wurde von Jelliffe (1967) verfaßt. Dem Autor gelang es, durch Reinigung eines Rohextraktes mit verschiedenen Lösungsmitteln und schließlicher dünnschichtchromatographischer Auftrennung des gereinigten Extraktes ca. 1,4 - 1,75mg des Glykosids im Mageninhalt nachzuweisen. Die aufgenommene Menge an Gitaligin lag bei 45mg, wobei die Patientin kurz nach Aufnahme des Glykosids erbrochen haben soll. Dem Autor standen 350ml an Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Derselbe Autor (Jelliffe et al., 1969) fand im Myokard von Patienten, die an Digitalisüberdosierung gestorben waren, unter Verwendung von Säulenchromatographie an

Aluminiumoxid, dünnschichtchromatographischer Trennung der gereinigten Extrakte und Colorimetrie erhöhte Glykosidspiegel.

Nach Homizid mit Digitoxin konnte Fisher (1962) in Leber und Herzmuskel das Gift dünnschichtchromatographisch nachweisen.

Kisser (1969) versetzte Leberhomogenisate im Gewicht von 300 - 400g mit Glykosidmengen zwischen 0,1 und 0,5mg und konnte sie nach Extraktion mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie nachweisen. Als Teilschritt in seinem Extraktionsverfahren kam ein Extraktionsapparat zur Anwendung.

Sybirskaja et al. (1969) konnten Scilla - Glykoside, die in selbstmörderischer Absicht aufgenommen worden waren und zum Tode geführt hatten, in Magen und Dünndarminhalt nachweisen. Das Untersuchungsmaterial wurde extrahiert und der Extrakt mehrmals gereinigt. Schließlich gelang der Nachweis der Scilla - Glykoside durch papierchromatographische Auftrennung des Extraktes und spektrophotometrische Bestimmung der, vom Papier eluierten Glykoside.

Ebenfalls in Magen - und Dünndarminhalt und auch in anderen Substraten konnten Lukkari et al. (1965) Herzglykoside dünnschichtchromatographisch nachweisen. Eine Reihe weiterer Arbeiten beschäftigt sich auch, wenn auch nicht ein Vergiftungsfall der Anlaß war, mit dem Nachweis von Herzglykosiden in tierischen Materialien, unter Anwendung von Dünnschichtchromatographie. Beispiele dieser Arbeiten sind die von Pfordte et al. (1970) deren Untersuchungsmaterial Blut und Muskelgewebe war. Seipel et al. (1968) untersuchten Blut und Gallenflüssigkeit, Grade et al. (1967) konnten

in Blut und Herz der Ratte Herzglykoside auffinden, Jelliffe (1906) gelang der Nachweis in Urin. Die verschiedensten Gewebe untersuchte Berke (1958).

Abschließend sei noch erwähnt, daß es auch gelang, Herzglykoside die in winziger Konzentration in Magenspülflüssigkeit vorlagen, ebenfalls nachzuweisen.

Febay - Peyroula et al. (1971) verwendeten für diesen Nachweis jedoch den sehr empfindlichen Enzyminhibitionstest. Sie fanden in einem Fall, bei welchem 10 µg Digitoxin eingenommen worden war, in der Flüssigkeit von einer nach 5h durchgeführten Magenspülung eine Digitoxinkonzentration von 80 µg / ml und eine Gesamtmenge von 0,90 mg. Im zweiten Fall betrug die aufgenommene Digitoxinmenge 0 mg und die Spülflüssigkeit der nach 15 min stattgehabten Magenspülung enthielt das Glykosid in einer Konzentration von 7 µg / ml. Die insgesamt extrahierte Glykosidmenge lag bei 7 µg.

11. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Zusammenstellung eines einfachen, billigen und schnellen Verfahrens zum qualitativen Nachweis von sieben Herzglykosiden (Digitoxin , Digoxin , 8 - Acetyl - Digoxin , 8 - Methyl - Digoxin , Lanatosid C , Proscillaridin , Convallariaglykoside) bzw. ihrer Spaltprodukte nach Hydrolyse durch die Säure des Magensaftes, in Mageninhalt. Das Verfahren gliedert sich in Extraktion der Herzglykoside aus dem Untersuchungsmaterial, chromatographische Auftrennung des Extraktes und Nachweis der Herzglykoside mit Hilfe geeigneter Referenzsubstanzen und

Sprühreagenzien (Arbeitsvorschrift s. Punkt 8.).
In Tab. 20 sind die Herzglykosidmengen zusammengefaßt,
die dem Untersuchungsmaterial pro 100g zugesetzt worden
waren und deren qualitativer Nachweis noch gelang.

Tab. 20: Im Untersuchungsmaterial nachgewiesene Mengen
der Herzglykoside (mg Herzglykosid / 100g
Untersuchungsmaterial)

Herzglykosid	Menge
-----	-----
Digitoxin	4,0
Digoxin	4,0
B - Acetyl - Digoxin	4,0
B - Methyl - Digoxin	4,0
Lanatosid C	6,0
Convallariaglykoside	6,0
Proscillaridin	5,0

Es ist, verglichen mit anderen in der Literatur angege-
benen dunnschichtchromatographischen Bestimmungsverfahren,
wesentlich vereinfacht, deshalb auch weniger empfindlich,
doch bietet es trotzdem eine gewisse Aussicht auf Erfolg.
Der gewonnene Extrakt kann, bei einem negativen Ergeb-
nis, noch empfindlicheren Bestimmungsverfahren, etwa dem
Radioimmunoassay zugeführt werden.

12. Literaturverzeichnis

- 1) Andersson, K.E,
Bertler, A.,
Wettrell, G. Post Mortem Distribution and
 Tissue Concentration of Digoxin
 in Infants and Adults
 Acta Paediatr. Scand. 64, 497
 (1975)

- 2) Asplund, J.,
Edhag, L.,
Nyquist, O.,
Orinius, E.,
Sjögren, A. Four Cases of Massive Digi-
 talis Poisoning
 Acta Med. Scand. 189, 293
 (1971)

- 3) Bachmann, M. Elektrokardiographische Beob-
 achtungen bei einem Fall von
 Suizidversuch mit 10mg Digitoxin
 Zeitschrift für Kreislauf-
 forschung 49, 982 (1960)

- 4) Bancher, Z. TLC R_f - Values of Some
 Cardiac Glykosides
 J. of Chromatography 141, 2 (1977)

- 5) Bazzano, G.,
Bazzano, G. Digitalis Intoxication. Treatment
 with a New Steroid - Binding
 Resin
 J. Am. Med. Ass., 220, 828 (1972)

- 6) Belpaire, F.M.,
Bogaert, M.G.,
de Broe, M.E. Radioimmunoassay of Digoxin in
 Renal Failure. A Comparison of
 different Commercial Kits.
 Clin. Chem. Acta 62, 255 (1975)

- 7) Bergy, G.G.,
Fergus, E.B.,
Bruce, R.A. Acute Massive Digitoxin Poison-
ing. Report of a Case and Review
of the Literature
Ann. of Int. Med. 46, 964 (1957)
- 8) Bertler, A.,
Redfors, A. An Improved Method of Estimating
Digoxin in Human Plasma
Clin. Pharmacol. Therapeutics
11, 665 (1970)
- 9) Bodem, G.,
Gilfrich, H.J. Methoden zur Bestimmung von Dig-
oxin im Blut und ihre klinische
Bedeutung
Klin. Wschr. 51, 57 (1973)
- 10) Borner, K.,
Rietbrock, N. Determination of Digoxin in
Serum. Comparison of Radioimmuno-
assay and a heterogeneous
Enzyme Immunoassay
J. Clin. Chem. and Clin. Biochem.
16, 335 (1978)
- 11) Boisio, M.L. Evaluation of Several Solvent
Systems in the Thin - Layer -
- Chromatographic Separation of
Aglycones and Glycosides from Chole-
sterol, Phytosterols and their Esters
J. Chromatogr. 73, 279 (1972)
- 12) Brandes, G.,
Suchowsky, G. Digitoxinsuizid
Ärztl. Wschr. 9, 134 (1954)

- 13) Buchanan, J. Self - Poisoning with Digoxin:
Successful Treatment with Atropine
Brit. Med. J. 3, 660 (1967)
- 14) Burnett, G.H., The Enzymatic Assay of Plasma
Conklin, R.L. Digitoxin Levels
J. of Lab. and Clin. Med. 71,
1040 (1968)
- 15) Chan, W., A Case of Self - Induced Digoxin
Ikram, H. Poisoning: With Hiss Bundle Studies
of the Site of Heart Block
New Zealand Med. J. 84, 443 (1976)
- 16) Curry, A.S., New Apparatus: A Continuous Ex-
Phang, S.E. tractor for Use in Toxicological
Analysis
J. of Pharmacy and Pharmacology
12, 437 (1960)
- 17) Doebling, W., Früherfassung der Digitalisintoxi-
König, E., kation mit einem Fragebogen
Reinhard, E. Med. Klin. 73, 1664 (1978)
- 18) El - Olemly, M.M., Chromatography on Lipophilic
Stohs, S.J. Dextran Gels for Fractionation
of Low Molecular weight Compounds II:
Separation of Cardiac Glycosides
from Cardiac Aglycones
J. Pharm. Sci. 64, 163 (1975)
- 19) Fisher, I. A Case of Digitalis Poisoning
Acta Med. Leg. et Soc., Liège
4, 85 (1962)

- 20) Forth, W.,
Henschler, D.,
Rummel, W. Allgemeine und spezielle Pharma-
kologie
Mannheim, Wien, Zürich (1977)
- 21) Frèrejaque, M.,
de Graeve, P. Réactions colorées et réactions
de fluorescence des digitaliques
Ann. Pharm. Franc. 21, 509 (1963)
- 22) Fülgraff, G.,
Palm, D. Pharmakotherapie, Klinische
Pharmakologie
Stuttgart, (1977)
- 23) Gjerdrum, K. Determination of Digitalis in
Blood
Acta Med. Scand. 187, 371 (1970)
- 24) Goldman, R.H. The Use of Serum Digoxin Levels
in Clinical Practice
J. Amer. Med. Ass. 229, 331 (1974)
- 25) Grade, K.,
Förster, W.,
Schulzek, S. An Improved Method for the
Isolation of Heart Glykosides from
Tissues by Using Sephadex G 200
Biochem. Pharm. 16, 1299 (1967)
- 26) Habermann, E.,
Müller, W.,
Schregelmann, A. Papierchromatographie von
Digitalis - Stoffen
Arzneimittelforsch. 3, 30 (1953)
- 27) Hagemeyer, F. Suicide with Aprindine and
Digoxin
Acta Cardiologica, Bruxelles
31, 161 (1976)

- 28) Heesen, H.,
Lahrtz, H. Verlauf und Behandlung von
schweren Digitalisintoxikationen
in suizidaler Absicht
Med. Klin. 70, 812 (1975)
- 29) Hess, T. Digitalisintoxikation
Med. Klin. 73, 3 (1978)
- 30) Hoeke, N.,
Exler, Th.J.H. Eenvoudige werkwijze voor de snelle
scheiding van digoxine, digitoxine
en acetyl-digitoxine met behulp van
dunnelaagchromatografie
Pharm. Weekblad 104, 877 (1969)
- 31) James, A.T. New Biochemical Separations
London (1964)
- 32) Jelliffe, R.W. A Chemical Determination of
Urinary Digitoxin and Digoxin in Man
J. of Lab. and Clin. Med.
67, 694 (1966)
- 33) Jelliffe, R.W. Autopsy Verification of suicide
by Digitalis
The Amer. J. of Clin. Path.
47, 180 (1967)
- 34) Jelliffe, R.W.,
Stephenson, R.G. A Fluorometric Determination of
Myocardial Digoxin at Autopsy, with
Identification of Digitalis Leaf,
Digitoxin and Gitoxin
The Amer. J. of Clin. Path.
51, 347 (1969)

- 35) Jensen, K.B. Paper Chromatography of Cardiac Glycosides and Aglycones from *Digitalis Purpurea*
Acta Pharm. et Toxicol.
9, 99 (1953)
- 36) Kisser, W. Nachweis und Identifizierung herzwirksamer Glykoside in der Toxikologie
Arch. Toxikol. 25, 27 (1969)
- 37) Kramer, P.,
Saul, J.,
Köthe, E.,
Scheler, F. Vereinfachte Schnellbestimmung von Plasma - Digoxin
Methodik und klinische Erfahrungen
Klin. Wschr. 53, 215 (1975)
- 38) Kuschinsky, G.,
Lüllmann, H. Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie
Stuttgart (1974)
- 39) Lemli, J. De Densitometrische Bepaling der Hartglykosiden in vers Digitalisblatt
Pharm. Tijdschr. vor Belgie
39, 1 (1962)
- 40) Lesne, M. La digitalinémie: revue de la méthode radioimmunologique de détermination et de ses indications
Thérapie , France 31, 567 (1976)
- 41) Lowenstein, J.M.,
Corrill, E.M. An improved Method for Measuring Plasma and Tissue Concentrations of *Digitalis* Glycosides
J. of Lab. and Clin. Med.
67, 1048 (1966)

- 42) Ludewig, R., Akute Vergiftungen
Lohs, K.H. Jena (1974)
- 43) Lukkari, I., Forensic Chemical Detection of
Antti, A. Digitalis Glycosides in Autopsy
Material
Ann. Med. exp. Fenn. 43, 188 (1965)
- 44) Macek, K. Pharmaceutical Applications of
Thin - Layer - and Paper - Chromatography
London (1972)
- 45) Mac Kinney, A.A., Comparison of Five Radioimmuno-
Burnett, G.H., assays and Enzyme Bioassay for
Conklin, L., Measurement of Digoxin in Blood
Wasson, W.G. Clin. Chem. 21, 857 (1975)
- 46) Marcus, F.J. Digitalis Pharmacokinetics and
Metabolism
The Amer. J. of Med. 58, 452 (1975)
- 47) Medzihradsky, F., Enzymatic Determination of
Nandhasri, P.S., Cardiac Glycosides
Khanna, U. Biochem. Med. 2, 285 (1971)
- 48) Möller, R. Hemmung der Membran - ATP ase
durch Herzglykoside
Med. Klin. 70, 1166 (1975)
- 49) Müller, R.K. Die toxikologisch - chemische
Analyse
Dresden (1976)

- 50) Neher, R. Steroid - Chromatographie
Amsterdam (1964)
- 51) Oliver, G.C., The Measurement of Digitoxin
Parker, B.M., in Human Serum by Radioimmunoassay
Brasfield, D.L., The J. of Clin. Investigation
Parker, C.W. 47, 1035 (1968)
- 52) Pebay - Peyroula, F., Assay of Digitalis Glycosides:
Gaultier, M., Its Application in Clinical
Nicaise, A.M. Toxicology
Clin. Toxicol. 4, 419 (1971)
- 53) Pfordte, K., Erfahrungen bei der quantitativen
Förster, W. Bestimmung von Kardenoliden und
ihren Metaboliten in biologischem
Material
Zeitschrift f. Med. Labortechnik
11, 272 (1970)
- 54) Pötter, H. Vacuumperforator zur Isolierung
temperaturempfindlicher und leicht
oxydierbarer Substanzen aus kleins-
ten Mengen von wässrigen oder fes-
ten Arzneimittelzubereitungen für
die quantitative papierchromato-
graphische Analyse
Die Pharmazie 20, 737 (1961)
- 55) Pötter, H. Quantitative Papierchromatographische
Bestimmung von Digitalis - Glyko-
siden
Die Pharmazie 18, 554 (1963)

- 56) Pötter, H. Dixanthyhlarnstoff, ein neues
Reagenz zur quantitativen Bestim-
mung von Digitalisglykosiden
Die Pharmazie 20, 737 (1965)
- 57) Pötter, H., Versuche zur dünn-schichtchromato-
Bärisch, H. graphischen Bestimmung der Digi-
talis - Glykoside
Die Pharmazie 5, 515 (1972)
- 58) Potter, M., L'Intoxication Digitalique
Perrot, L., Massive
Restoy, R., Paris (1964)
Vedrinne, J.
- 59) Reisert, P.M., Klinisch wichtige Kreuzreaktionen
Kistner, M. bei der radioimmunologischen
Bestimmung von Digoxin
Fortschr. Med. 95, 167 (1971)
- 60) Repke, K. Die chemische Bestimmung von
Digitoxin in Geweben und Ausschei-
dungen
Arch. exper. Path. u. Pharmacol.
233, 261 (1958)
- 61) Rowson, J.M. The Extraction and Evaluation of
Digitalis Purpurea Leaf
J. of Pharmacy and Pharmacol.
7, 924 (1955)
- 62) Rowson, J.M. The Colorimetric Estimation of
Digitoxin and of Preparations of
Digitalis Purpurea
J. of Pharmacy and Pharmacol.
4, 814 (1952)

- 63) Seipel, H.,
Hueber, E.F.,
Deutsch, E.,
Lutz, U.,
Wichl, M.,
Jentzsch, K. Quantitative Digitoxinbestimmung
im Blut routinemäßig digitali-
sierter Patienten
Klin. Wschr. 46, 1257 (1968)
- 64) Sjöholm, I. Thin - Layer Chromatography of
Digitalis Glycosides
Svensk Farmaceutisk Tidskrift
66, 321 (1962)
- 65) Smith, T.W.,
Haber, E. Digitalis, Clinical Value of the
Radioimmunoassay of the Digitalis
Glycosides
Pharmacol. Reviews 25, 219 (1973)
- 66) Smith, T.W.,
Haber, E. Digitalis
New Engl. J. of Med. 289, 1067,
1125 (1973)
- 67) Smith, T.W. Antikörper gegen Digitalis -
- Intoxikationen
Praxis - Kurier 22, 4 (1976)
- 68) Sonanini, T. Beitrag zur Dünnschichtchromato-
graphie von Digitalis-Cardenoliden
Pharm. Acta Helv. 39, 673 (1964)
- 69) Stahl, E. Dünnschichtchromatographie -
ein Laboratoriumshandbuch
Berlin (1967)

- 70) Steinegger, E., Dünnschichtchromatographie von
van der Walt, J.H. Herzglykosiden
Pharm. Acta Helv. 36, 599 (1961)

- 71) Swanson, M. Saliva Levels, Digitalis toxicity
J. Amer. Med. Ass. 227, 1008 (1974)

- 72) Sybirska, H., Entdeckung von Glykosiden der
Kozlicka-Gajdzinska, H. Scilla maritima in Sektionsmaterial
eines Selbstmordfalles
Arch. Toxikol. 24, 332 (1969)

- 73) Thomopoulos, T., Abuse of Digitalis
Kokkinos, D. Brit. Med. J. 2, 170 (1965)

- 74) van der Vijgh, W.J.F. Modification of a Commercially
Available Digoxin Radioimmunoassay
Kit for Higher Precision
Clin. Chem. 21, 1172 (1975)

- 75) Walsh, Ph.R., Measurement of Digoxin by Radio-
Crawford, J.F., immunoassay
Hawker, C.D. Annals of Clin. and Lab. Science
7, 79 (1977)

- 76) Wang, M.H. TLC - R_f - Values of Cardiac
Glycosides
J. of Chromatography 141, 2 (1977)
(Chrom. Reviews 21, 2, 1977)

- 77) Wessels, F.,
Samizadeh, A.,
Losse, H.
Diagnose der Digitalisintoxikation
durch Bestimmung der Erythrozyten -
- Elektrolyte
Klin. Wschr. 52, 451 (1974)
- 78) White, B.J.,
Oeth, D.
Separation of Cardiac Glycosides
by Thin - Layer Chromatography
Proc. Iowa Acad. of Science
73, 101 (1966)
- 79) Zeegers, J.J.W.,
Maas, A.H.J.,
Willebrands, A.F.,
Kruyswijk, H.M.,
Jambroes, G.
The Radioimmunoassay of
Plasma - Digoxin
Clin. Chem. Acta 44, 109 (1973)

Herrn Prof. Dr. med. H.-D. Wuermeling, Direktor des
Instituts für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-
Nürnberg, danke ich für die Überlassung eines Arbeits-
platzes und für die Übernahme des Korreferats.

Frau Prof. Dr. Dr. med. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
danke ich für die Überlassung des Themas und für die
freundliche Unterstützung.

An dieser Stelle möchte ich auch den Mitarbeitern des
Instituts für ihre Hilfe Bei der Durchführung der Ar-
beit danken.

LEBENS LAUF

Am 23. November 1951 wurde ich, Hans Leonhardt Rohr als Sohn des Kaufmanns Hans Rohr und seiner Ehefrau Else Rohr, geb. Taucher in Wunsiedel geboren.

Vom Herbst 1958 an besuchte ich die Volksschule in meiner Heimatstadt und trat im Herbst 1962 in die 1. Klasse des math. - nat. Gymnasiums Wunsiedel über. Nach neunjährigem Besuch des Gymnasiums Wunsiedel habe ich dort im Sommer 1971 das Abitur absolviert. Seit dem Sommersemester 1973 studiere ich an der Friedrich - Alexander - Universität Erlangen - Nürnberg das Fach Medizin.

Im Wintersemester 74 / 75 legte ich das Physikum ab. Nach Bestehen des ersten und des zweiten Teils der ärztlichen Prüfung leistete ich die einjährige, praktische Ausbildung als Medizinalpraktikant an den Universitätskliniken Erlangen für Innere Medizin, Chirurgie und Nervenheilkunde ab. Im Mai 1980 bestand ich den dritten Teil des Staatsexamens.

